(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0026897**

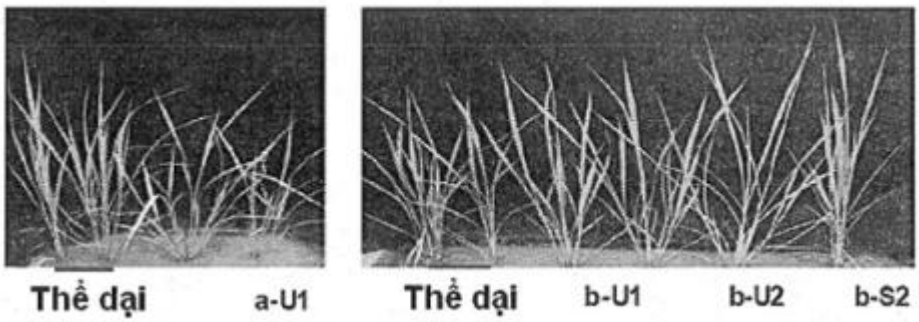
(51)[7] **C12N 15/82**

(13) **B**

(21) 1-2015-03212 (22) 05/02/2014
(86) PCT/GB2014/050327 05/02/2014 (87) WO2014/122452 14/08/2014
(30) PCT/CN2013/071384 05/02/2013 CN
(45) 25/01/2021 394 (43) 25/01/2016 334A
(73) 1. PLANT BIOSCIENCE LIMITED (GB)
Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich Norfolk NR4 7UH, Great Britain
2. NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY (CN)
1 Weigang Street, Nanjing City, Jiangsu 210095, China
(72) XU, Guohua (CN); FAN, Xiaorong (CN); SHEN, Qirong (CN); MILLER, Anthony (GB).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA THỰC VẬT, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT CHUYỂN GEN VÀ THỰC VẬT CHUYỂN GEN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng sống sót và/hoặc khả năng hấp thu nitơ của thực vật; phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen; và thực vật chuyển gen.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen biểu hiện gen vận chuyển nitrat cải thiện được các tính trạng, như khả năng sinh trưởng và hiệu suất sử dụng nitơ, phương pháp sản xuất thực vật này và phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng và hiệu suất sử dụng nitơ của thực vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Năng suất cây trồng trên thế giới đã tăng đáng kể trong năm thập kỷ qua chủ yếu nhờ việc cải thiện giống cây trồng và sử dụng nhiều phân bón hóa học, đặc biệt là phân đạm (N)[1,2]. Tuy nhiên, hiệu suất sử dụng phân đạm của nhiều cây trồng chỉ nằm trong khoảng từ 30% đến 50%[2-4], phần còn lại bị thất thoát vào môi trường, dẫn đến nhiều tác động bất lợi, như ô nhiễm không khí và nguồn nước và làm mất đa dạng sinh học[5,6]. Đã ước tính được rằng ở Liên minh Châu Âu, lượng nitơ dư thừa trong môi trường hiện tiêu tốn từ 70 tỷ euro đến 320 tỷ euro mỗi năm[7]. Ở Trung Quốc, năng suất hạt đã tăng trong 30 năm qua cùng với việc giảm mạnh hiệu suất sử dụng nitơ từ 55 xuống đến 20kg hạt/kg phân đạm được bón[3]. Ở Châu Á, lúa gạo chiếm hơn 70% lượng calo tiêu thụ hàng ngày của người dân, tuy nhiên với việc diện tích đất nông nghiệp ngày càng giảm, thì nhu cầu lúa gạo ngày càng tăng chỉ có thể được giải quyết bằng cách tăng năng suất.

Do đó, việc xác định các bước then chốt trong kiểm soát hiệu suất sử dụng nitơ của thực vật có vai trò quan trọng. Hiệu suất sử dụng nitơ có thể được xác định bằng cách lấy năng suất hạt chia cho lượng nitơ có trong đất (bao gồm lượng nitơ còn dư trong đất và trong phân bón). Do đó, hiệu suất sử dụng nitơ có thể được phân thành hai loại: hiệu suất hấp thu (NupE; khả năng thực vật hút nitơ từ đất dưới dạng nitrat và amoni) và hiệu suất hữu dụng (NutE; khả năng sử dụng nitơ để tạo ra năng suất hạt). Điều này đặc biệt quan trọng đối với các loại cây ngũ cốc mà cần bón lượng lớn phân đạm để đạt được năng suất cao nhất và hiệu suất sử dụng nitơ được ước tính là nhỏ hơn 50% (Hirel *et al*).

Nitơ (N) là nguồn dinh dưỡng thiết yếu cho sự phát triển của cây trồng do nguyên tố này là thành phần cơ bản của nhiều hợp chất hữu cơ, axit nucleic và protein. Nguồn

dinh dưỡng nitơ ảnh hưởng đến toàn bộ các chức năng của thực vật, từ chuyển hóa đến phân phối nguồn dự trữ, sinh trưởng, và phát triển. Nguồn dinh dưỡng nitơ phong phú nhất mà rễ thực vật có thể hấp thu được là nitrat (NO_3^-) có trong đất thoáng khí tự nhiên, nhờ quá trình nitrat hóa phân hữu cơ và phân đạm. Trái lại, amoni (NH_4^+) là hợp chất nitơ chính có trong đất ruộng ngập nước không thoáng khí (*Sasakawa and Yamamoto*, 1978).

Do đó, nitơ vô cơ trong đất (N) mà thực vật có thể sử dụng có mặt dưới dạng nitrat trong đất thoáng khí và đất thoát nước tốt và dưới dạng amoni trong đất thoát nước kém và đất ngập nước. Ở nhiều thực vật, nitrat hấp thu bởi rễ được vận chuyển đến chồi trước khi được đồng hóa (Smirnoff and Stewart, 1985). Trái lại, amoni có nguồn gốc từ quá trình khử nitrat hoặc hấp thu trực tiếp amoni được đồng hóa chủ yếu ở rễ, sau đó được vận chuyển ở dạng hữu cơ đến chồi (Xu *et al.*, 2012). Để thích nghi với các nồng độ nitrat khác nhau trong đất, rễ của thực vật đã phát triển ít nhất ba hệ thống hấp thu nitrat, hai hệ thống vận chuyển ái lực mạnh (HATS) và một hệ thống vận chuyển ái lực thấp (LATS), thích hợp để hấp thu nitrat (*Crawford and Glass*, 1998). HATS cấu trúc (cHATS) và HATS cảm ứng nitrat (iHATS) có khả năng hấp thu nitrat ở nồng độ thấp trong môi trường bên ngoài với độ bão hòa nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,5mM. Trái lại, LATS hấp thu nitrat ở nồng độ cao hơn trong môi trường bên ngoài. Quá trình hấp thu bởi LATS và HATS được điều hòa bởi các gen vận chuyển nirat lần lượt thuộc họ NRT1 và NRT2 (Forde, 2000; Miller *et al.*, 2007). Quá trình hấp thu bởi rễ được điều hòa bởi tín hiệu phản hồi âm, liên kết biểu hiện và hoạt tính hấp thu nitrat với tình trạng nitơ của thực vật (Miller *et al.*, 2007). Một số chất chuyển hóa khác của nitơ được phát hiện là các cảm biến tế bào của tình trạng nitơ, bao gồm glutamin (Fan *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008) và một mô hình coi khoang dự trữ nitrat ở rễ là tín hiệu phản hồi vì thể tích các khoang này tăng theo tình trạng nitơ của thực vật.

Mặc dù thực vật bậc cao có khả năng sử dụng nitơ hữu cơ, nhưng nguồn nitơ được hấp thu chủ yếu bởi rễ lại là NO_3^- và NH_4^+. Thực vật có khả năng thay đổi thích nghi đáng kể để đáp ứng với hai nguồn nitơ này. Mặc dù NH_4^+ là nguồn nitơ thích hợp hơn, do quá trình chuyển hóa của nó cần ít năng lượng hơn NO_3^-, nhưng rất ít loài thực vật có khả năng hấp thu tốt NH_4^+ khi nó là nguồn nitơ duy nhất. Ví dụ về các loài này bao gồm cây lá kim phương bắc, các loài đỗ quyên, một số loại rau, và cây lúa (*Oryza sativa* L.). Trái ngược với các loài này, hầu hết các cây nông nghiệp bị nhiễm độc nghiêm trọng với NH_4^+, do đó các loài này chỉ sinh trưởng mạnh trên NO_3^-. Tuy nhiên, khi cả hai nguồn

nitơ này được sử dụng đồng thời, thì khả năng sinh trưởng và năng suất được cải thiện đáng kể so với khả năng sinh trưởng chỉ trên NH_4^+ hoặc NO_3^- (Kronzucker *et al.*, 1999).

Lúa, nguồn cung cấp lương thực chính cho khoảng 50% dân số thế giới, khác với các cây lương thực khác ở chỗ có khả năng sinh trưởng trên NH_4^+ như một nguồn nitơ duy nhất. Lúa được gieo cấy theo phương pháp truyền thống trong điều kiện đất ngập nước không thoáng khí với nguồn nitơ chính là amoni. Tuy nhiên, các tế bào mô thông khí chuyên biệt ở rễ lúa có thể vận chuyển oxy từ chồi đến rễ và giải phóng oxy vào vùng rễ, nơi diễn ra quá trình biến đổi amoni thành nitrat (quá trình nitrat hóa) bởi vi khuẩn[8]. Quá trình nitrat hóa trong vùng rễ ngập nước có thể tạo ra từ 25% đến 40% tổng lượng nitơ được cây trồng hấp thu ở dạng nitrat, chủ yếu thông qua hệ vận chuyển ái lực mạnh (HATS)[9]. Quá trình hấp thu nitrat được điều hòa bởi cơ chế đồng vận chuyển với proton (H^+) được đẩy ra khỏi tế bào bởi H^+-ATPaza ở màng sinh chất[10]. Cơ chế phân tử của quá trình hấp thu và vận chuyển nitrat ở cây lúa chưa hoàn được được biết rõ. Do nồng độ nitrat ở vùng rễ của lúa được ước tính là nhỏ hơn 10μM (Kirk and Kronzucker, 2005), nên các gen thuộc họ NRT2 đóng vai trò quan trọng trong hấp thu nitrat ở cây lúa (Araki and Hasegawa, 2006; Yan *et al.*, 2011). Ngoài ra, rễ lúa có nhiều mô thông khí để vận chuyển oxy vào vùng rễ, tạo ra quá trình nitrat hóa amoni bởi vi khuẩn ở bề mặt rễ (Kirk, 2003; Li *et al.*, 2008). Do đó, có tới 40% tổng lượng nitơ được hấp thu bởi rễ lúa trong điều kiện đất ngập nước có thể ở dạng nitrat và tốc độ hấp thu có thể tương đương với tốc độ hấp thu amoni (Kronzucker *et al.*, 2000; Kirk and Kronzucker, 2005).

Các nghiên cứu phân tử và điện sinh lý cho thấy rằng quá trình hấp thu nitrat thông qua cả HATS lẫn LATS được điều hòa bởi gen đồng vận chuyển proton/nitrat (Zhou *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2007). Ở bộ gen của mù tạc, có ít nhất 53 và 7 gen lần lượt thuộc họ NRT1 và NRT2 (Miller *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007). Một số gen thuộc họ NRT1 và NRT2 của mù tạc có chức năng hấp thu và vận chuyển nitrat đặc trưng trên quãng đường dài. AtNRT1.1 (CHL1) là gen chuyển cảm biến đóng vai trò là gen vận chuyển nitrat ái lực kép và gen cảm biến với nồng độ nitrat ở môi trường bên ngoài (Liu and Tsay, 2003; Ho *et al.*, 2009; Gojon *et al.*, 2011), và gen vận chuyển auxin ở nồng độ nitrat thấp (Krouk *et al.*, 2010). Trái lại, AtNRT1.2 (NTL1) là gen vận chuyển nitrat ái lực yếu được biểu hiện cấu trúc (Huang *et al.*, 1999). AtNRT1.4 là gen vận chuyển nitrat được biểu hiện ở cuống lá và đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa cân bằng nội mô nitrat ở lá và sự phát triển của lá (Chiu *et al.*, 2004). AtNRT1.5 được biểu hiện ở tế

bào trụ bì của rễ nằm gần mô gỗ và có chức năng nạp nitrat vào mô gỗ để vận chuyển nitrat từ rễ đến chồi (Lin *et al.*, 2008). AtNRT1.6 chỉ được biểu hiện ở mô sinh sản và tham gia vào quá trình phân bố nitrat từ mô mẹ đến phôi phát triển sớm (Almagro *et al.*, 2008). AtNRT1.7 có chức năng nạp nitrat vào mô libe để cho phép vận chuyển nitrat ra khỏi lá già và vào lá non, cho thấy rằng quá trình tái vận chuyển vào-ra của nitrat được điều hòa bởi mô libe (Fan *et al.*, 2009). AtNRT1.8 được biểu hiện chủ yếu ở tế bào nhu mô gỗ nằm trong hệ mạch và đóng vai trò trong việc thu hồi nitrat từ dịch mô gỗ (Li *et al.*, 2010). AtNRT1.9 tạo điều kiện thuận lợi cho việc nạp nitrat vào mô libe ở rễ, tăng cường vận chuyển hướng xuống dưới ở rễ, và gen bất hoạt của nó làm tăng vận chuyển nitrat từ rễ đến mô gỗ ở chồi (Wang and Tsay, 2011).

Trong số 7 gen thuộc họ NRT2 ở cây Mù tạc, cả AtNRT2.1 lẫn AtNRT2.2 đều là các gen bổ trợ cho iHATS (Filleur *et al.*, 2001). Ngoài ra, hoạt tính vận chuyển của NRT2.1 cần có protein đồng vận chuyển thứ hai NAR2.1 (hoặc NRT3.1) ở cây Mù tạc (Okamoto *et al.*, 2006; Orsel *et al.*, 2006; Yong *et al.*, 2010). Việc làm bất hoạt gen AtNAR2.1 (thể đột biến atnar2.1) có nhiều ảnh hưởng đến cả quá trình hấp thu nitrat ở nồng độ nitrat thấp lẫn khả năng sinh trưởng hơn việc làm bất hoạt gen AtNRT2.1 (thể đột biến atnrt2.1), cho thấy AtNAR2.1 có các chức năng khác (Orsel *et al.*, 2006). Điều ngạc nhiên là, AtNRT2.7 được biểu hiện đặc hiệu ở màng không bào của các cơ quan sinh sản và kiểm soát lượng nitrat ở hạt (Chopin *et al.*, 2007). Gần đây, AtNRT2.4 được phát hiện là gen vận chuyển nitrat màng phân sinh ái lực mạnh được biểu hiện ở lớp biểu bì của rễ nhánh và nằm ở hoặc nằm gần mô libe của chồi (Kiba *et al.*, 2012). AtNRT2.4 tham gia vào quá trình hấp thu NO_3^- bởi rễ ở nồng độ bên ngoài rất thấp và nạp NO_3^- ở chồi vào mô libe và quan trọng trong điều kiện nghèo nitơ (Kiba *et al.*, 2012).

Trong bộ gen của lúa, năm gen NRT2 đã được xác định (Araki and Hasegawa, 2006; Cai *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2011). OsNRT2.1 và OsNRT2.2 có chung trình tự vùng mã hóa giống nhau với các vùng không phiên mã đầu 5' và 3' khác nhau (UTRs) và có độ tương đồng cao với gen NRT2 của các thực vật một lá mầm khác, trong khi đó OsNRT2.3 và OsNRT2.4 có mối liên hệ di truyền gần hơn với gen NRT2 ở Mù tạc. ARN thông tin mã hóa bởi OsNRT2.3 thực tế được ghép nối thành hai sản phẩm gen, OsNRT2.3a (AK109776) và OsNRT2.3b (AK072215), với độ tương đồng của các trình tự axit amin mã hóa bởi hai sản phẩm gen này bằng 94,2% (Feng *et al.*, 2011, Yan *et al.*, 2011). OsNRT2.3a được biểu hiện chủ yếu ở rễ và quá trình này được tăng cường bằng

cách bón nitrat, trong khi đó OsNRT2.3b được biểu hiện yếu ở rễ và có tương đối nhiều ở chồi và dạng và nồng độ nitơ không ảnh hưởng đến số lượng bản sao phiên mã của nó (Feng *et al.*, 2011, Feng 2012).

CN101392257 đề cập đến việc phân tích biểu hiện của OsNRT2.3a và OsNRT2.3b ở cây lúa và tế bào trứng ếch Xenopus và sự biểu hiện quá mức gen OsNRT2.3 ở thực vật. CN101392257 không hề đề cập đến việc biểu hiện riêng rẽ của OsNRT2.3a và OsNRT2.3b ở cây lúa, và cũng không chỉ ra rằng việc biểu hiện OsNRT2.3b ở các thực vật không phải lúa có khác biệt đáng kể về nguồn nitơ sử dụng có thể tạo ra các tác dụng có lợi.

Vẫn cần có cây trồng có kiểu gen cho hiệu quả dinh dưỡng cao hơn để đảm bảo năng suất và vấn đề an ninh lương thực bền vững trên toàn cầu, để giảm chi phí và tác động tiêu cực đến môi trường của phân bón hóa học, như ô nhiễm nguồn khí, nguồn nước và mất đa dạng sinh học. Sáng chế được thực hiện nhằm giải quyết các vấn đề này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Protein vận chuyển nitrat ở cây lúa OsNRT2.3 có hai dạng biến thể ghép nối. Một số protein vận chuyển nitrat cần được mã hóa bởi hai gen để có thể thực hiện chức năng vận chuyển nitrat; thành phần thứ hai có kích cỡ rất nhỏ ($OsNAR2_1$) là cần thiết để hướng đích chính xác protein vận chuyển này vào màng sinh chất. Biến thể ghép nối thứ nhất OsNRT2.3a cần phải có thành phần thứ hai này để thực hiện chức năng vận chuyển nitrat, trong khi đó biến thể ghép nối OsNRT2.3b thì không cần. Các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng việc biểu hiện cả hai gen vận chuyển nitrat này ở tế bào trứng ếch Xenopus cho thấy rằng chỉ gen OsNRT2.3b là có vị trí điều hòa nhạy với độ pH nằm ở phía bào tương của protein này. Vị trí cảm biến độ pH này được kiểm chứng bằng đột biến điểm có định hướng của gốc axit amin histiđin (H167R) ở cấu trúc cảm biến độ pH. Ở cây lúa, gen OsNRT2.3b có nhiều ở mô mạch, đặc biệt là mô libe. Do đó, các tác giả sáng chế cho rằng protein OsNRT2.3b tham gia vào quá trình vận chuyển nitrat trên quãng đường dài trong thực vật và mô libe có vai trò quan trọng trong việc điều hòa độ pH ở toàn bộ thực vật.

Các tác giả sáng chế đã biểu hiện quá mức một cách độc lập cả hai gen OsNRT2.3a và OsNRT2.3b và thể đột biến H167R của OsNRT2.3b bằng cách sử dụng vùng khởi đầu cấu trúc không đặc hiệu có ái lực mạnh (vùng khởi đầu 35S và vùng khởi

đầu ubiquitin) trên một số giống lúa ở Trung Quốc. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng chỉ các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b cải thiện được đáng kể khả năng sinh trưởng, hiệu suất sử dụng nitơ và kiểu hình do mức độ hấp thu cả nitrat lẫn amoni đều tăng ở các giống lúa này. Các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b có khả năng quang hô hấp thấp hơn và khả năng điều hòa độ pH (hàm lượng sắt và phosphat) cao hơn so với các giống lúa đối chứng và các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3a. Cấu trúc cảm biến độ pH của OsNRT2.3b có vai trò quan trọng đối với các tác dụng này ở cây lúa bằng cách liên hợp trạng thái độ pH của lúa với dạng nitrat được bón vào.

Các tác giả sáng chế cũng bất ngờ phát hiện thấy rằng OsNRT2.3b cũng thể hiện các chức năng nêu trên khi được biểu hiện ở các thực vật không phải là lúa, như mù tạc, lúa mỳ và thuốc lá, mặc dù các thực vật này có sự khác biệt cơ bản về nguồn nitơ cần sử dụng.

Các khía cạnh cụ thể của sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp, việc sử dụng và thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa. Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp, việc sử dụng và thực vật, trong đó quá trình biểu hiện axit nucleic OsNRT2.3b được điều hòa bởi vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe. Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp, việc sử dụng và thực vật không biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc biến thể chức năng của nó.

Mục đích của sáng chế là đề cập đến các phương án cụ thể sau:

1. Phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng sống sót và/hoặc khả năng hấp thu nitơ của thực vật bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi trình tự axit nucleic này mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, thì thực vật này không phải là cây lúa, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3; hoặc

c) được chọn từ trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.15 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.15.

2. Phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen có khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước:

a) bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật hoặc tế bào thực vật, trong đó khi trình tự axit nucleic này mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, thì thực vật này không phải là cây lúa, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3; hoặc

c) được chọn từ trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.15 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.15.

3. Phương pháp điều hòa cân bằng pH nội mô hoặc làm giảm mức độ axit hóa trong thực vật bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3; hoặc

c) được chọn từ trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.15 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.15

4. Phương pháp biến đổi khả năng vận chuyển nitrat và cân bằng pH nội mô của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó axit nucleic này chứa đột biến ở cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16).

5. Phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng sống sót, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hấp thu nitơ của thực vật bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

6. Phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen có khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật hoặc tế bào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

7. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe.

8. Phương pháp theo phương án 7, trong vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe này chứa axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

9. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó thực vật này là cây lương thực được chọn từ ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương.

10. Thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1; hoặc

c) được chọn từ trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.14 hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.14.

11. Thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

12. Thực vật theo phương án 10 hoặc 11, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe.

13. Thực vật theo phương án 12, trong vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe này chứa axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

14. Thực vật theo phương án 10 hoặc 11, trong đó thực vật này là cây lương thực được chọn từ ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn thông qua các hình vẽ sau.

Fig.1 là hình vẽ thể hiện kiểu hình của các giống lúa Nipponbare biểu hiện quá mức OsNRT2.3a và OsNRT2.3b.

Fig.1a là hình ảnh thể hiện các cây lúa thế hệ T_2 trồng trên đất thử nghiệm ở giai đoạn sinh sản dinh dưỡng (60 ngày). Fig.1b là hình vẽ thể hiện giai đoạn sinh sản (120 ngày). Fig.1c là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng với các đoạn mồi đặc hiệu. Fig.1d là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích thấm tách Western với kháng thể đơn dòng để xác định biểu hiện protein. Fig.1e là hình ảnh thể hiện kết quả lai tại chỗ ARN ở cây lúa thể dại và cây lúa b-S6 bằng mẫu đò đối chứng âm, các ký hiệu p: mô libe, x: mô gỗ; e: tế bào biểu bì; m: tế bào diệp lục. Mặt cắt ngang là mảnh cắt có kích cỡ từ 5 đến 6cm từ phần đỉnh lá thứ nhất của các cây lúa được thể hiện trong Fig.1a. Khung tỷ lệ = 10μm.

Fig.2 là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm trên cánh đồng của các giống lúa thế hệ T_2 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b.

Fig.2a là hình ảnh thể hiện quá trình sinh trưởng của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b b-U1, b-U2, b-S2 và b-S6 ở các tỷ lệ phân đạm khác nhau (Từ tháng 5/2010 đến 10/2010, các hình ảnh được chụp vào ngày 16/09/2010) ở trại thử nghiệm Changxing, Đại học Zhejiang. Việc sử dụng phân đạm được thể hiện ở góc trái của mỗi hình ảnh với bảng hiệu tiếng Trung Quốc ở giữa cánh đồng. Fig.2b là hình vẽ thể hiện năng suất hạt của các cây lúa được gieo trồng trong các điều kiện được thể hiện trên Fig.2a. Fig.2c là hình vẽ thể hiện hiệu suất sử dụng nitơ trong các điều kiện được thể hiện trên Fig.2a. Fig.2d là ảnh chụp thể hiện thử nghiệm trên quy mô lớn, 1.280 cây con của mỗi giống lúa được trồng vào đất ruộng. Fig.2e là biểu đồ thể hiện năng suất hạt của các

cây lúa được gieo trồng trong các điều kiện được thể hiện trên Fig.2d. Fig.2f là biểu đồ thể hiện hiệu suất sử dụng nitơ của Hiệu suất sử dụng nitơ các cây lúa được gieo trồng trong các điều kiện được thể hiện trên Fig.2d. Các ký hiệu Hiệu suất sử dụng nitơ: hiệu suất sử dụng nitơ = năng suất hạt (g)/lượng phân đạm đã bón (g). Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Dấu hoa thị * nằm trên các thanh đồ thị thể hiện mức độ khác biệt (*$p < 0,05$) giữa các giống lúa chuyển gen và giống lúa thể dại ở cùng tỷ lệ bón phân đạm được ước lượng bằng phương pháp ANOVA.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện tác dụng của quá trình biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đến lưu lượng $^{15}NO_3^-$ và $1^5NH_4^+$ bởi rễ, NO_3^- và NH_4^+ ở mô gỗ, độ pH ở mô gỗ, mức độ axit hóa ở mô libe ở điều kiện 2,5mM NO_3^- hoặc NH_4^+. Fig.3a là biểu đồ thể hiện lưu lượng ^{15}N khi bón phân nitrat hoặc amoni. Fig.3b là biểu đồ thể hiện lưu lượng NO_3^- và NH_4^+ khi bón phân nitrat hoặc amoni ở mô gỗ trong 24 giờ. Fig.3c là biểu đồ thể hiện độ pH trong dịch mô gỗ khi bón phân nitrat hoặc amoni. Fig.3d là biểu đồ thể hiện mức độ axit hóa ở mô libe khi bón phân nitrat hoặc amoni, dịch mô libe được thu nhận bằng EDTA-Na_2[16]. Fig.3e là biểu đồ thể hiện mức độ axit hóa ở mô libe khi bón phân nitrat hoặc amoni, dịch mô libe được thu nhận bằng côn trùng. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 5). Dấu hoa thị * nằm trên các thanh đồ thị thể hiện mức độ khác biệt (*$p < 0,05$) giữa các giống lúa chuyển gen và giống lúa thể dại ở cùng phương thức xử lý được ước lượng bằng phương pháp ANOVA. Các biểu đồ từ trái sang phải lần lượt thể hiện giống lúa thể dại, giống lúa b-U1, giống lúa b-U2, giống lúa b-S2, và giống lúa b-S6

Fig.4 là biểu đồ thể hiện tác dụng của quá trình biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đến mức độ hấp thu các dạng nitơ khác nhau ở độ pH = 4 và độ pH =6. Các biểu đồ từ trái sang phải lần lượt thể hiện giống lúa thể dại, giống lúa b-U1, giống lúa b-U2, giống lúa b-S2, và giống lúa b-S6.

Fig.4a là biểu đồ thể hiện mức độ hấp thu ^{15}N khi bón $NH_4{}^{15}NO_3$. Fig.4b là biểu đồ thể hiện lưu lượng ^{15}N khi bón $^{15}NH_4NO_3$. Fig.4c là biểu đồ thể hiện lưu lượng ^{15}N khi bón $^{15}NH_4{}^{15}NO_3$.Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 5). các chữ cái a, b, c nằm trên các biểu đồ cột thể hiện mức độ khác biệt ($p < 0,05$) giữa các giống lúa chuyển gen và giống lúa thể dại ở cùng phương thức xử lý được ước lượng bằng phương pháp ANOVA.

Fig.5 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích chức năng của axit nucleic OsNRT2.3b ở tế bào trứng của ếch Xenopus.

Fig.5a là đồ thị thể hiện điện cực pH kép dùng để đo độ pH bào tương từ tế bào trứng của ếch Xenopus được tiêm OsNRT2.3b, được xử lý với 1mM nitrat (đồ thị được làm bóng) và rửa bằng nước muối độ pH = 8,0 (đồ thị màu xám). Fig.5b là đồ thị thể hiện điện thế màng đối với 1mM nitrat (đồ thị được làm bóng) cho tế bào trứng của ếch Xenopus biểu hiện thể đột biến H167R của OsNRT2.3b. Fig.5c là biểu đồ thể hiện mức độ hấp thu ^{15}N-nitrat bởi tế bào trứng ếch Xenopus được tiêm với nước, ARN thông tin mã hóa bởi OsNRT2.3b và biến thể H167R của nó. Fig.5d là biểu đồ thể hiện mức độ hấp thu ^{15}N-nitrat bởi tế bào trứng ếch Xenopus được tiêm với nước và ARN thông tin mã hóa bởi OsNRT2.3b ở các độ pH bên ngoài khác nhau qua đêm. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các tế bào này được thử nghiệm bằng điện sinh lý để đảm bảo các tế bào vẫn hoạt động sau khi ủ. Dấu hoa thị * nằm trên các thanh đồ thị thể hiện mức độ khác biệt (*$p < 0,05$) được ước lượng bằng phương pháp ANOVA.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện khối lượng tươi (Fig.6A), chiều dài rễ (Fig.6B), và nồng độ nitrat ở mô (Fig.6C) của 3 giống mù tạc biểu hiện quá mức OsNRT2.3 so với giống mù tạc thể dại . Các biểu đồ từ trái sang phải trên Fig.6C lần lượt thể hiện nồng độ nitrat ở mô rễ/chồi của các giống mù tạc 23b.1, 23b.2, 23b.3, và giống mù tạc thể dại.

Fig.7 là hình ảnh thể hiện kết quả so sánh về kiểu hình của các cây thuốc lá biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và cây thuốc lá thể dại. Sự khác biệt về khả năng sinh trưởng của các giống cây thuốc lá thế hệ T_1 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b trong chậu cát. Thể dại: giống *Nicotiana tabacum* 89, các cây thuốc lá thế hệ T_1 được sinh trưởng trong 2 tháng trên môi trường dinh dưỡng Hoagland đầy đủ có bổ sung 10mM nitrat.

Fig.8 là hình ảnh thể hiện kết quả so sánh phân tích biểu hiện của các cây thuốc lá biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và cây thuốc lá thể dại. Fig.8A là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích thấm tách Southern của giống cây thuốc lá Kpn I biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, ADN của các cây thuốc lá thế hệ T_1 được phân cắt bằng enzym HindIII và mẫu dò Hyb được sử dụng để lai hóa, trong đó Ld: gen chỉ thị, P: mẫu đối chứng dương, b-20 là mẫu đối chứng âm. Fig.8B là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCT định lượng ADN bổ sung của các giống cây thuốc lá thể hệ T1 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và các

đoạn mồi đặc hiệu cho axit nucleic OsNRT2.3b được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện sinh khối và hiệu suất sử dụng nitơ của các giống cây thuốc lá biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được sinh trưởng trong chậu cát, trong đó giống thể dại: giống *Nicotiana tabacum* 89, các cây thuốc lá thế hệ T_1 được sinh trưởng trong 2 tháng trên môi trường dinh dưỡng Hoagland đầy đủ có bổ sung 10mM nitrat. Hiệu suất sử dụng nitơ = Sinh khối/tổng lượng phân đạm được bón).

Fig.10 là hình vẽ thể hiện cấu trúc gen của OsNRT2.3a và OsNRT2.3b (SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.1, peptit OsNRT2.3a và OsNRT2.3b là SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4). Phân tích trình tự ADN bộ gen OsNRT2.3 cho thấy đoạn intron của *OsNRT2.3b* nằm giữa đoạn có chiều dài + 190bp và đoạn có chiều dài +280bp từ bộ ba mã hóa ATG để hoạt hóa dịch mã. Đối với *OsNRT2.3a*, thì đoạn không dịch mã đầu 5' có chiều dài 42bp và đoạn không dịch mã đầu 3' có chiều dài 249bp và đối với *OsNRT2.3b*, thì đoạn không dịch mã đầu 5' có chiều dài 223bp và đoạn không dịch mã đầu 3' có chiều dài 316 bp. F có nghĩa là mồi xuôi: đặc hiệu cho *OsNRT2.3b* và R là mồi ngược đặc hiệu cho *OsNRT2.3b*.

Fig.11 là hình ảnh thể hiện giống lúa Nipponbare thế hệ T_2 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được trồng ở tỉnh Hải Nam, Trung Quốc. Fig.11a là hình ảnh thể hiện giống lúa chịu mặn chuyển gen Nipponbare thế hệ T_2 được gieo trồng ở trại thử nghiệm Ledong thuộc Đại học Nông nghiệp Nanjing, tỉnh Hải Nam, Trung Quốc (12/2009 đến 4/2010). Điều kiện dinh dưỡng của đất trước khi bón phân bao gồm lượng nitơ tổng số (N): 1,0 ± 0,2mg/g, lượng phospho tổng số (P): 0,4 ± 0,1mg/g, lượng kali tổng số (K) 39,5 ± 2,3mg/g, nồng độ $NaHCO_3$: 0,5mM, lượng P hòa tan (P Olsen) 23,1 ± 4,1mg/kg, độ pH của đất: 4,4 ± 0,5 (số lượng mẫu = 6). Hình ảnh này được chụp vào ngày 28/02/2010 và các cây lúa được sinh trưởng trong 75 ngày từ khi nảy mầm trong điều kiện hàm lượng nitơ bằng 75kg/ha. Fig.11b là hình ảnh thể hiện bông lúa; Fig.11c là biểu đồ thể hiện chiều dài bông lúa; Fig.11d và Fig.11e lần lượt là biểu đồ thể hiện số lượng thân cấp một và số lượng thân cấp hai; Fig.11f là biểu đồ thể hiện năng suất hạt. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 10), dấu hoa thị * thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và cây lúa biểu hiện quá mức ở mức ý nghĩa thống kê 5% bằng phân tích một

biến ANOVA. Các biểu đồ từ trái qua phải lần lượt thể hiện các giống lúa thể dại, a-U1, a-U2, b-U1, b-U2, b-S2, và b-S6.

Fig.12 là hình ảnh thể hiện kiểu hình của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3*b* và giống lúa thể dại WYJ7. Fig.12a là hình ảnh thể hiện các cây lúa được trồng thử nghiệm trong chậu tại Đại học Nông nghiệp Nanjing vào năm 2010. Các giống lúa thế hệ T_1 396-2, 369-1, 366-1 và 342-1 được biểu hiện quá mức với OsNRT2.3b so với giống lúa thể dại (WYJ7). Các hạt được gieo vào ngày 20/05 và hình ảnh này được chụp vào ngày 20/10 trước khi thu hoạch; Fig.12 b là hình ảnh thể hiện kết quả thấm tách Southern của các cây con thế hệ T1. Sau đó, các giống lúa 396-2, 369-1, 366-1 và 342-1 được đặt tên lại lá 396, 369, 366 và 342 trong các thử nghiệm thực hiện trên giống lúa thế hệ T_2; Fig.12c là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng với các đoạn mồi đặc hiệu với 26oChu kỳ PCR. Fig.12d là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm trên các giống lúa thế hệ T_2 ở trại thử nghiệm thuộc Đại học Nông nghiệp Nanjing (05/2011 đến 10/2011) với lượng phân đạm được bón là 110kg/ha và 220kg/ha. Các hạt được gieo vào ngày 05/05/2011, sau đó 100 cây mạ được trồng vào ruộng với 5 hàng mỗi hàng 20 cây vào ngày 05/06 và được bố trí ngẫu nhiên. Phân được bón như được thể hiện trên Fig.2. Hình ảnh này được chụp vào ngày 10/10 trước khi thu hoạch. Điều kiện dinh dưỡng của đất trước khi bón phân bao gồm: lượng nitơ tổng số (N): 1,68 ± 0,21mg/g, lượng phospho tổng số (P): 0,48 ± 0,18mg/g, lượng kali tổng số (K): 46,47 ± 2,85mg/g, nồng độ $NaHCO_3$: 0,5mM, lượng P hòa tan: 38 ± 2,1mg/kg, độ pH của đất = 6,43 ± 0 ,28 (n = 6); Fig.12e và Fig.12f là biểu đồ lần lượt thể hiện năng suất hạt và hiệu suất sử dụng nitơ. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3), dấu hoa thị * thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và cây lúa biểu hiện quá mức ở mức ý nghĩa thống kê 5% bằng phân tích một biến ANOVA. Các biểu đồ từ trái qua phải lần lượt thể hiện các giống lúa thể dại, 396, 369, 366, và 342.

Fig.13 là hình ảnh thể hiện tác dụng của sự biểu hiện quá mức axit nucleic trên giống lúa thể dại YF47. Fig.13a là hình ảnh thể hiện đặc tính sinh trưởng của giống lúa thể dại YF47 và giống lúa chuyển gen biểu hiện quá mức *NRT2.3b* (YF/NRT2.3b(O)) được trồng ở trại thử nghiệm Hải Nam thuộc Đại học Nông nghiệp Nanjing (12/2011 đến 04/2012). Các hạt được gieo vào ngày 10/12 và hình ảnh này được chụp vào ngày 01/04, 15 ngày trước khi thu hoạch; Fig.13b là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng về mức độ phiên mã của *NRT2.3b* ở giống lúa thể dại YF47 và giống lúa chuyển

gen. Fig.13c là hình ảnh thể hiện kết quả thấm tách Southern của giống lúa chuyển gen; Fig.13d là biểu đồ thể hiện năng suất hạt/cây của giống lúa thể dại YF47 và giống lúa chuyển gen. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 50). Điều kiện dinh dưỡng của đất trước khi bón phân bao gồm: lượng nitơ tổng số (N): 1,5 ± 0,2mg/g, lượng phospho tổng số (P): 0,3 ± 0,1mg/g, lượng kali tổng số (K) 3,5 ± 0,3mg/g, nồng độ $NaHCO_3$: 0,5mM, lượng P hòa tan: 24,1 ± 4,7mg/kg, độ pH của đất = 6,45 ± 0,47 (n = 9). Các biểu đồ từ trái qua phải lần lượt thể hiện các giống lúa thể dại, 296, 269, 266, 342.

Fig.14 là hình vẽ thể hiện kiểu hình của các giống lúa chuyển gen Nipponbare thế hệ T_5 biểu hiện quá mức OsNRT2.3*b*. Fig.14a là hình ảnh thể hiện các giống lúa chuyển gen Nipponbare thế hệ T_5 b-S2 và b-S6 được gieo trồng ở trại thử nghiệm Ledong thuộc Đại học Nông nghiệp Nanjing, tỉnh Hải Nam (12/2011 đến 04/2012), các hạt (300 hạt) được gieo vào ngày 10/12. các cây mạ (200 cây) được cấy vào ruộng vào ngày 05/01. Hình ảnh này được chụp vào ngày 13/04 trước khi thu hoạch. Lô ruộng thử nghiệm có kích cỡ 20m x 25m, phân lân và phân kali được bón vào ruộng với hàm lượng lần lượt bằng 60kg/ha và 110kg/ha trước khi cấy mạ. Phân đạm được bón vào ruộng ở hai hàm lượng bằng 110kg/ha và 220kg/ha. Phân đạm được bón lần thứ nhất với lượng bằng 20% lượng nitơ tổng số trước khi cấy mạ vào ngày 28/12. Phân đạm được bón lần thứ hai với lượng bằng 40% lượng nitơ tổng số vào ngày 12/01. Phân đạm được bón lần cuối cùng vào ngày 20/01. Fig.14b là biểu đồ thể hiện năng suất hạt.

Fig.15 là hình ảnh thể hiện kiểu hình của giống lúa Nipponbare thế hệ F_2 (♀) × b-S6 T5(♂).

Fig.16 là hình ảnh thể hiện sự khác biệt về kiểu hình giữa các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và giống lúa thể dại được trồng trong chậu thử nghiệm cuối giai đoạn sinh trưởng. Thử nghiệm này được thực hiện theo cách thức như được mô tả trong Bảng 1 và quá trình sinh trưởng được quan sát ở 76 ngày (Fig.16a); 84 ngày (Fig.16b); 88 ngày (Fig.16c); 98 ngày (Fig.16d); 120 ngày (Fig.16e) và 140 ngày sau khi cấy (Fig.16f). Năng suất hạt (Fig.16g), lượng niơ tổng số (Fig.16h) và NUtE = khối lượng hạt/lượng nitơ tổng số (Fig.16i) của giống lúa thể dại, b-S2 và b-S6 được đo riêng ở 120 ngày và 140 ngày. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 10), dấu hoa thị * thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và cây lúa biểu hiện quá mức ở mức ý nghĩa thống

kê 5% bằng phân tích một biến ANOVA. Các biểu đồ này chỉ được thực hiện với giống lúa thể dại và giống lúa b-S6 do hai giống lúa này dễ phân biệt hơn so với toàn bộ ba giống lúa trên Fig.16. Do đó, vải đen được sử dụng làm phông chụp và tách riêng các chậu trồng giống lúa thể dại và các chậu giống lúa b-S6 khỏi các chậu trồn giống lúa b-S2, nằm phía sau phông vải này.

Fig.17 là hình ảnh thể hiện phương pháp lấy mẫu dịch mô libe bằng rầy nâu (*Nilapavata lugens*). Các cây mạ được trồng trong môi trường nước chứa 1,25mM NH_4NO_3 trong 8 tuần, sau đó chuyển sang bón phân đạm (N: 2,5mM NO_3^-; A: 2,5mM NH_4^-). Mỗi cây được đặt trong bình dung tích 250mL chứa dung dịch dinh dưỡng IRRI với 6 cây được đặt trong buồng côn trùng ở nhiệt độ 26°C và 16 giờ chiếu sáng. Bảy đến mười rầy nâu trưởng thành được chuyển nhiễm vào mỗi cây khi bắt đầu bón phân đạm. Dịch mô libe tiết ra bởi rầy nâu được thu gom sau 24 giờ, 48 giờ bón phân đạm. Độ pH ở dịch mô libe được đo bằng vi điện cực pH chọn lọc[22]; Fig.17a là biểu đồ thể hiện độ pH mô libe khi bón phân nitrat; Fig.17b là biểu đồ độ pH mô libe khi bón phân amoni. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 10), dấu hoa thị * thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và giống lúa b-S6 ở mức ý nghĩa thống kê 5% bằng phân tích một biến ANOVA.

Fig.18 là hình ảnh thể hiện độ pH không bào ở rễ của giống lúa b-S6 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và giống lúa thể dại sau 72 giờ bón phân đạm. Các cây mạ được sinh trưởng trong dung dịch dinh dưỡng đầy đủ chứa 1,25mM NH_4NO_3 trong 4 tuần, sau đó chuyển sang bón phân đạm (N: 2,5mM NO_3^-; A: 2,5mM NH_4^-) trong 72 giờ. Fig.18a là hình ảnh thể hiện độ pH không bào ở rễ lúa. Sau 72 giờ bón phân đạm, rễ lúa được rửa bằng cách nhúng vào dung dịch $CaSO_4$ 0,2mM trong một phút trước khi chuyển sang môi trường thạch[17]. Cây lúa nguyên vẹn được đặt vào môi trường thạch (0,9g/L, chứa chất chỉ thị pH (0,03g/L tím bromcresol[17]). Độ pH ban đầu nằm trong khoảng từ 5,2 đến 5,3 từ 11:00 đến 11:30 sáng, và các rễ lúa được giữ trong bóng tối bao phủ bằng khăn giấy ẩm trên đĩa Plexiglas có kích cỡ 0,5x12x12cm^3 và hình ảnh được chụp sau 2 đến 4 giờ tiếp xúc với môi trường thạch chứa chất chỉ thị pH.; Fig.18b là hình ảnh thể hiện độ pH không bào trên môi trường thạch sau khi cắt bỏ rễ; Fig.18c là đồ thị thể hiện sự thay đổi độ pH trong thời gian dài của môi trường sinh trưởng chứa nước trong quá trình bón phân đạm.

Fig.19 là biểu đồ thể hiện nồng độ P và Fe ở lá của giống lúa Nipponbare thế hệ T_2 biểu hiện quá mức OsNRT2.3*b* được sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy chứa nước có bổ sung 1,25mM $NH4NO_3$. Nồng độ P và Fe tổng số được đo bằng phương pháp ICP. Bột nguyên liệu thực vật đã được sấy khô (0,05g) được phân giải bằng 5mL H_2SO_4 98% và 3mL hyđro peroxit 30%. Sau khi làm nguội, mẫu đã phân giải được pha loãng đến 100mL với nước vô trùng. Nồng độ ion trong dung dịch này được đo bằng ICP- OES (Perkin Elmer Optima 2000 DV). Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 4), dấu hoa thị * thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và cây lúa biểu hiện quá mức ở mức ý nghĩa thống kê 5% bằng phân tích một biến ANOVA. Các biểu đồ từ trái qua phải lần lượt thể hiện nồng độ P và Fe ở lá của các giống lúa thể dại, b-U1, b-U2, b-S2, và b-S6.

Fig.20 là biểu đồ thể hiện nồng độ CO_2 trong quá trình quang hợp, nồng độ CO_2 nội bào và nồng độ CO_2 trong quá trình hô hấp ở các cây lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3 so với cây lúa thể dại. Nồng độ CO_2 trong quá trình quang hợp, nồng độ CO_2 nội bào và nồng độ CO_2 trong quá trình hô hấp được đo bằng máy phân tích khí hồng ngoại Li-Cor 6400 như được mô tả nêu trên[41]. Fig.20a là biểu đồ thể hiện nồng độ CO2 tổng số được tính bằng thời gian quang hợp thực tế củvùng lá được đo; Fig.20b là biểu đồ thể hiện nồng độ CO2 nội bào; Fig.20c là biểu đồ thể hiện hệ số hô hấp thực tế (R_n) đạt được quá trình đo CO_2 PIB ở giai đoạn đo ổn định từ 100 đến 200 giây sau khi tắt ánh sáng, theo Fig.4 của tài liệu Kebeish *et al.*, 2007[22]. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 4), dấu hoa thị * thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và cây lúa biểu hiện quá mức ở mức ý nghĩa thống kê 5% bằng phân tích một biến ANOVA

Fig.21 là hình ảnh thể hiện các giống lúa Nipponbare đột biến biểu hiện quá mức OsNRT2.3b H167R. Fig.21a là hình ảnh thể hiện các giống lúa đột biến biểu hiện quá mức OsNRT2.3b H167R OvH1, OvH2 và giống lúa thể dại trồng trong chậu thử nghiệm (05/2012 đến 09/2012) toàn bộ các hệ thống gieo cấy là giống như trong Bảng 1. Hình ảnh này được chụp vào ngày 10/09; Fig.21b là biểu đồ thể hiện năng suất hạt. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 60); Fig.21c là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng với cùng đoạn mồi đặc hiệu cho OsNRT2.3b, mà bao trùm vị trí đột biến; Fig.21d là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích thấm tách Southern.

Fig.22 là biểu đồ thể hiện mức độ hấp thu $^{15}N\text{-}NH_4^+$ bởi tế bào trứng ếch Xenopus được tiêm với nước hoặc ARN thông tin mã hóa bởi axit nucleic OsNRT2.3b. 0,5mM $^{15}N\text{-}NH_4Cl$ (% nguyên tử ^{15}N = 98%) được bổ sung vào dung dịch ND96 và tế bào trứng ếch Xenopus được ủ qua đêm (16 giờ). Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15).

Fig.23 là hình vẽ thể hiện thiết kế thử nghiệm trên đồng ruộng được thể hiện trong Fig.2a và Fig.2d. Các thử nghiệm trên đồng ruộng với các cây lúa thế hệ T_2 được thực hiện ở trại thử nghiệm Changxing thuộc Đại học Zhejiang. Đối với Fig.2a, các cây lúa được trồng vào các thửa ruộng bên phải với 4 mức độ bón phân đạm: không bón phân đạm, 75kg N/ha, 150kg N/ha và 300kg N/ha; đối với Fig.2d, các cây lúa được trồng vào các thửa ruộng bên trái và được bón phân đạm với lượng 75kg N /ha. Mỗi thửa ruộng thử nghiệm có kích cỡ 20 m×30 m và phân lân và phân kali được bón vào ruộng với hàm lượng lần lượt bằng 60kg/ha và 110kg/ha trước khi cấy mạ; Fig.23b là bảng số liệu thể hiện lượng phân đạm được bón ở mỗi thửa ruộng; Fig.23c là bảng số liệu thể hiện sự bố trí các cây lúa trên Fig.2a với cùng số lượng hàng và khoảng cách giữa các cây như được thể hiện trên Fig.23d; Fig.23d là bảng số liệu thể hiện sự bố trí các cây lúa trên Fig.2d. Toàn bộ các thử nghiệm được lặp lại 3 lần được bố trí ngẫu nhiên.

Fig.24 là bảng số liệu thể hiện các gen vận chuyển nitrat NRT2 giả định chứa cấu trúc cảm biến độ pH được xác định trong axit nucleic OsNRT2.3b.

Dấu hoa thị * thể hiện các gen tiềm năng nhất cho các gen tương đồng OsNRT2.3.

Cơ sở dữ liệu để tra cứu: Công cụ tra cứu trình tự Blast từ phytozome 9 http://www.phytozome.net/.

Cơ sở dữ liệu để tra cứu trình tự gen của lúa mỳ:

http://www.cerealsdb.uk.net/CerealsDB/Documents/DOC_search_reads.php.

Cơ sở dữ liệu để tra cứu trình tự gen của lúa mạch: http://webblast.ipk-gatersleben.de/lúa mạch/.

Các cấu trúc trao đổi anion protein màng (chứa gen cảm biến độ pH) được xác định bằng http://www.bioinf.manchester.ac.uk/cgi-bin/dbbrowser/fingerPRINTScan/FPScan_fam.cgi.

Fig.25 là biểu đồ thể hiện tác dụng tăng cường cân bằng độ pH ở mô libe của sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b. Thể dại: cây lúa thể dại; b-S6: giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b; H167R: giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b H167R. Độ pH dịch mô libe được đo bằng điện cực chọn lọc pH. Dịch mô libe được thu gom bằng phương pháp sử dụng rầy nâu (*Nilapavata lugens*). Các cây mạ được trồng trong môi trường nước chứa 1,25mM NH_4NO_3 trong 8 tuần, sau đó chuyển sang bón phân đạm (N: 2,5mM NO_3^-; A: 2,5mM NH_4^+). Mỗi cây được đặt trong bình dung tích 250mL chứa dung dịch dinh dưỡng IRRI với 6 cây được đặt trong buồng côn trùng ở nhiệt độ 26°C và 16 giờ chiếu sáng. Bảy đến mười rầy nâu trưởng thành được chuyển nhiễm vào mỗi cây khi bắt đầu bón phân đạm. Dịch mô libe tiết ra bởi rầy nâu được thu gom sau 24 giờ bón phân đạm. Các kết quả này cho thấy độ pH ở mô libe của giống lúa thể dại và giống lúa H167R là gần bằng nhau khi bón bằng các dạng phân đạm khác nhau, tuy nhiên độ pH ở mô libe của giống lúa b-S6 là bằng 7 khi bón phân đạm nitrat, và gần bằng độ pH trung tính khi bón cả hai dạng phân đạm.

Fig.26 là biểu đồ thể hiện khả năng sốt sót của giống lúa chuyển gen.

Fig.27 là biểu đồ thể hiện sinh khối của giống lúa mỳ chuyển gen OsNRT2.3b.

Fig.28 là hình ảnh thể hiện sự sinh trưởng của các giống lúa mỳ chuyển gen OsNRT2.3b khi bón ít và nhiều phân đạm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Các khía cạnh khác nhau của sáng chế được mô tả chi tiết trong các phần mô tả dưới đây. Mỗi khía cạnh cụ thể có thể được kết hợp với các khía cạnh khác trừ khi có quy định khác. Cụ thể, dấu hiệu bất kỳ thể hiện khía cạnh ưu tiên hoặc có lợi theo sáng chế có thể được kết hợp với dấu hiệu bất kỳ thể hiện khía cạnh ưu tiên hoặc có lợi khác theo sáng chế .

Trừ khi có quy định khác, các kỹ thuật thực vật học, vi sinh vật học, nuôi cấy mô, sinh học phân tử, hóa học, sinh hóa và kỹ thuật ADN tái tổ hợp, tin sinh học đã biết trong lĩnh vực này được sử dụng trong sáng chế. Các kỹ thuật này được mô tả chi tiết trong các tài liệu chuyên ngành.

Thuật ngữ "axit nucleic", "trình tự axit nucleic", "nucleotit", "phân tử axit nucleic" hoặc "polynucleotit" được dùng trong bản mô tả để chỉ phân tử ADN (ví dụ,

ADN bổ sung hoặc ADN bộ gen), phân tử ARN (ví dụ, ARN thông tin), phân tử ADN hoặc ARN tổng hợp, đột biến, có trong tự nhiên, và các đồng đẳng của ADN hoặc ARN được tạo ra bằng các đồng đẳng nucleotit. Axit nucleic có thể là phân tử sợi đơn hoặc sợi kép. Ví dụ về axit nucleic hoặc polynucleotit này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự mã hóa của gen cấu trúc, trình tự khuôn, và trình tự điều hòa không mã hóa ARN thông tin hoặc sản phẩm protein. Các thuật ngữ này cũng được dùng để chỉ gen. Thuật ngữ "gen" hoặc "trình tự gen" được dùng trong bản mô tả để chỉ axit nucleic ADN có chức năng sinh học. Do đó, gen có thể chứa các đoạn intron và exon như trong trình tự bộ gen, hoặc có thể chỉ chứa trình tự mã hóa như trong ADN bổ sung, và/hoặc có thể chứa ADN bổ sung kết hợp với trình tự điều hòa.

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" được dùng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ polyme có chiều dài bất kỳ chứa các axit amin được liên kết với nhau bởi liên kết peptit.

Thuật ngữ "chuyển gen", "gen chuyển" hoặc "tái tổ hợp" được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự axit nucleic, cat-xet biểu hiện, gen cấu trúc hoặc vectơ chứa trình tự axit nucleic hoặc sinh vật được biến nạp với trình tự axit nucleic, cat-xet biểu hiện hoặc vectơ theo sáng chế, toàn bộ các cấu trúc này được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp, trong đó một trong hai:

(a) trình tự axit nucleic mã hóa protein hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế, hoặc

(b) trình tự điều hòa gen mà được liên kết điều khiển với trình tự axit nucleic theo sáng chế, ví dụ vùng khởi đầu, hoặc

(c) a) và b)

không nằm trong môi trường di truyền tự nhiên của chúng hoặc đã được cải biến bằng phương pháp tái tổ hợp, ví dụ phương pháp cải biến để tạo ra dạng thay thế, bổ sung, loại bỏ, đảo ngược hoặc chèn một hoặc nhiều gốc nucleotit. Cần hiểu rằng môi trường di truyền tự nhiên có nghĩa là vị trí trên nhiễm sắc thể hoặc bộ gen tự nhiên trong thực vật ban đầu hoặc có mặt trong thư viện bộ gen. Trong trường hợp của thư viện bộ gen, tốt hơn nếu môi trường di truyền tự nhiên của trình tự axit nucleic vẫn được giữ lại, ít nhất là một phần môi trường di truyền tự nhiên của axit nucleic được giữ lại. Môi trường tự nhiên giới hạn trình tự axit nucleic ít nhất trên một đầu và có chiều dài ít nhất

bằng 50 bp, tốt hơn nếu ít nhất bằng 500 bp, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 1000 bp, tốt nhất nếu ít nhất bằng 5.000bp. Cat-xet biểu hiện có trong tự nhiên - ví dụ cat-xet kết hợp có trong tự nhiên chứa vùng khởi đầu tự nhiên của trình tự axit nucleic với trình tự axit nucleic tương ứng mã hóa polypeptit hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế, như nêu trên - là cat-xet biểu hiện gen chuyển khi cat-xet biểu hiện này được cải biến bằng phương pháp không tự nhiên, tổng hợp ("nhân tạo"), ví dụ phương pháp đột biến gen. Ví dụ về các phương pháp thích hợp được mô tả trong US 5,565,350 hoặc WO00/15815 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Do đó, cần hiểu rằng thực vật chuyển gen theo sáng chế có nghĩa là axit nucleic theo sáng chế không nằm ở vị trí tự nhiên của nó trong bộ gen của thực vật này, và axit nucleic này có thể được biểu hiện tương đồng hoặc không tương đồng. Tuy nhiên, thuật ngữ "chuyển gen" cũng có nghĩa là khi axit nucleic theo các phương án khác nhau của sáng chế nằm ở vị trí tự nhiên của nó trong bộ gen của thực vật, thì trình tự này đã được cải biến so với trình tự tự nhiên, và/hoặc trình tự điều hòa của trình tự tự nhiên đã được cải biến. Tốt hơn nếu, cần hiểu rằng thuật ngữ "chuyển gen" có nghĩa là axit nucleic theo sáng chế được biểu hiện ở vị trí không tự nhiên trong bộ gen, tức là axit nucleic theo sáng chế được biểu hiện tương đồng, hoặc tốt hơn nếu, axit nucleic theo sáng chế được biểu hiện không tương đồng.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp và không bao gồm các phương án chỉ dựa trên việc tạo ra thực vật bằng phương pháp nhân giống truyền thống.

Peptit OsNRT2.3b được biểu hiện theo sáng chế có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3. Theo sáng chế, trình tự axit nucleic SEQ ID NO.1 (OsNRT2.3b) mã hóa polypeptit SEQ ID NO.3 (OsNRT2.3b). Trình tự axit nucleic SEQ ID NO.2 (OsNRT2.3a) mã hóa polypeptit SEQ ID NO.4 (OsNRT2.3a). Các gen cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.67 mà tương đương với mã truy cập số AK072215 của OsNRT2.3b theo sáng chế. Khi đề cập đến axit nucleic mã hóa OsNRT2.3a, điều này cũng đề cập đến mã truy cập số AK0109776 của OsNRT2.3a như nêu trong SEQ ID NO.68 theo sáng chế.

Các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng việc biểu hiện quá mức OsNRT2.3 ở các giống lúa khác nhau đã làm tăng năng suất hạt lên đến 40% và hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện trong cả điều kiện bón ít lẫn bón nhiều phân đạm trong các thử

nghiệm trên đồng ruộng. Mức độ biểu hiện gen hô hấp giảm ở giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3 cho thấy rằng hiệu suất quang hợp được cải thiện là yếu tố tạo ra năng suất được cải thiện. Điều ngạc nhiên là, các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, mà đã được kiểm chứng ở cả mức độ phiên mã lẫn hàm lượng protein (Fig.1c và Fig.1d), có khả năng sinh trưởng cao hơn giống lúa thể dại (Fig.1a và Fig.1b, Fig.11). Sinh khối rơm rạ và chiều dài bông lúa của các giống lúa biểu hiện quá mức cao hơn giống lúa thể dại (Fig.11, Bảng 2 và Bảng 3). Do chiều dài thân cấp một và cấp hai tăng, nên tổng số lượng hạt/bông lúa cao hơn giống lúa thể dại (Fig.11, Bảng 2). Trái lại, các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3a không có sự khác biệt về các tính trạng so với giống lúa thể dại cho dù mức độ biểu hiện ARN thông tin OsNRT2.3a và hàm lượng protein tăng ở các giống lúa chuyển gen (Fig.1c và Fig.1d, Fig.11).

Việc biểu hiện quá mức OsNRT2.3 cũng làm tăng cân bằng pH nội mô, dẫn đến làm tăng mức độ hấp thu nitơ tổng số, tích tụ P và Fe. Các kết quả này chứng tỏ rằng việc kết hợp sự hấp thu nitơ, cân bằng pH nội mô và hiệu suất quang hợp là yếu tố quan trọng để cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ và năng suất.

Do đó, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng OsNRT2.3b, bao gồm cả OsNRT2.3a, có thể được sử dụng để cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ và các tính trạng khác khi được biểu hiện ở thực vật. Theo đó, theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (OsNRT2.3b), biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó, nhưng thực vật này không biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 (OsNRT2.3a) và các phương pháp và sử dụng liên quan. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, hiệu suất sử dụng nitơ và/hoặc khả năng hấp thu nitơ, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (OsNRT2.3b) được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 (OsNRT2.3a).

Sáng chế cũng bao gồm một khía cạnh khác. Như nêu trên, quá trình chuyển hóa nitơ ở cây lúa là khác với quá trình chuyển hóa nitơ ở các cây trồng quan trọng khác.

Đáng ngạc nhiên, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng việc biểu hiện OsNRT2.3b từ lúa, là thực vật mà trái ngược với toàn bộ các cây trồng quan trọng khác, có khả năng sinh trưởng mạnh trên NH_4, là hữu hiệu khi được biểu hiện ở các loài thực vật khác mà sử dụng nguồn nitơ là NO_3^-. Hơn nữa, biểu hiện OsNRT2.3b ở các thực vật khác tạo ra kiểu hình có lợi mà có khả năng sinh trưởng, năng suất và hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện, không chỉ ở cây lúa, mà còn ở các thực vật khác. Do đó, OsNRT2.3b từ lúa có thể được sử dụng trong phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng chống chịu dịch bệnh và hiệu suất sử dụng nitơ ở thực vật theo sáng chế. Ví dụ, việc biểu hiện quá mức OsNRT2.3b ở cây thuốc lá hoặc ở cây lúa mỳ làm tăng sinh khối như nêu trong các ví dụ thực hiện sáng chế.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật, trong đó khi axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc biến thể chức năng hoặc một đoạn của nó được biểu hiện, thì thực vật này không phải là cây lúa và các phương pháp và sử dụng liên quan. Theo một phương án, sáng chế cũng đề cập đến thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc khả năng vận chuyển nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc biến thể chức năng hoặc một đoạn của nó được biểu hiện, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc khả năng vận chuyển nitơ của thực vật này không phải là cây lúa, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng hoặc một đoạn của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc khả năng vận chuyển nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện năng suất của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa.

Thuật ngữ "năng suất" được dùng trong bản mô tả để chỉ một hoặc nhiều đặc tính không hạn chế bao gồm: thời gian trổ bông sớm, sinh khối (sinh khối thực vật (sinh khối rễ và/hoặc chồi) hoặc sinh khối hạt/hạt giống), năng suất hạt/hạt giống, khả năng sống sót và hiệu suất nảy mầm của hạt/hạt giống, kích cỡ hạt/hạt giống, hàm lượng tinh bột của hạt, sức khỏe cây trồng ban đầu, độ phủ xanh, tốc độ sinh trưởng tăng, chậm lão hóa mô diệp lục. Thuật ngữ "năng suất" được dùng trong bản mô tả cũng để chỉ sản phẩm có giá trị kinh tế có thể đo được của cây trồng, khu vực và khoảng thời gian cụ thể. Các bộ phận riêng biệt của thực vật góp phần trực tiếp tạo ra năng suất được dựa trên số lượng, kích cỡ và/hoặc khối lượng của chúng. Năng suất thực tế là năng suất tính trên một m_2 cho một cây trồng trong một năm, được xác định bằng cách lấy năng suất tổng số (bao gồm cả năng suất thu hoạch lẫn năng suất gieo trồng) chia cho diện tích gieo trồng tính bằng m^2.

Do đó, theo sáng chế năng suất bao gồm một hoặc nhiều đặc tính và có thể được đo bằng cách đánh giá một hoặc nhiều đặc tính: năng suất hạt tăng/thực vật, tốc độ trám

đầy hạt tăng, số lượng hạt được trám đầy tăng, năng suất thu hoạch tăng, hiệu suất nảy mầm/sống sót tăng, tăng số lượng hoặc kích cỡ hạt/quả nang/vỏ quả/hạt giống, khả năng sinh trưởng tăng hoặc khả năng đẻ nhánh tăng, ví dụ cụm hoa với nhiều nhánh, sinh khối tăng hoặc số lượng hạt giống được trám đầy tăng. Tốt hơn nếu, năng suất tăng bao gồm tăng số lượng hạt giống/hạt/quả nang/vỏ quả, sinh khối tăng, khả năng sinh trưởng tăng, tăng số lượng cơ quan tạo hoa và/hoặc hoa tăng đẻ nhánh. Mức tăng năng suất so với thực vật đối chứng.

Ví dụ, mức tăng năng suất bằng 2%, 3%, 4%, 5% đến 50% hoặc cao hơn so với thực vật đối chứng, ví dụ ít nhất bằng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% hoặc 50%.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một phương án, phương pháp này cải thiện hiệu suất nitơ khi bón nhiều phân đạm. Theo một phương án khác, phương pháp này cải thiện hiệu suất nitơ khi bón ít phân đạm.

Hiệu suất sử dụng nitơ có thể được xác định bằng cách lấy năng suất hạt chỉ cho lượng nitơ có trong đất (bao gồm lượng nitơ còn dư trong đất và trong phân bón). Hiệu suất sử dụng nitơ tổng số của thực vật bao gồm cả hiệu suất hấp thu lẫn sử dụng và có thể được tính là UpE.

Ví dụ, mức độ tăng hiệu suất sử dụng nitơ bằng 5% đến 50% hoặc cao hơn so với thực vật đối chứng, ví dụ ít nhất bằng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% hoặc 50%.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng hấp thu nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng hấp thu nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Ví dụ, mức tăng khả năng hấp thu nitơ bằng 10% đến 50% hoặc cao hơn so với thực vật đối chứng, ví dụ ít nhất bằng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% hoặc 50%.

Theo một phương án của các phương pháp khác nhau theo sáng chế để cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng hấp thu nitơ và/hoặc vận chuyển nitrat, các tính trạng này tăng trong các điều kiện khắc nghiệt, ví dụ điều kiện nghèo nitơ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng vận chuyển nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit

nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng vận chuyển nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc khả năng sống sót của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc khả năng sống sót của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Ví dụ về dịch bệnh bao gồm bệnh héo vàng. Các dịch bệnh khác đã biết trong lĩnh vực này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ "yếu tố điều hòa", "trình tự điều hòa", "trình tự điều khiển" và "vùng khởi đầu" được dùng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ trình tự axit nucleic điều hòa có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của trình tự mà chúng gắn vào. Thuật ngữ "vùng khởi đầu" được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự axit nucleic điều khiển nằm trước điểm khởi đầu phiên mã của gen và tham gia vào việc nhận diện và gắn kết ARN polymeaza và các protein khác, nhờ đó điều khiển được quá trình phiên mã axit nucleic được liên kết điều khiển. Các thuật ngữ nêu trên cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự điều hòa phiên mã có nguồn gốc từ bộ gen của sinh vật nhân thật cổ (bao gồm hộp TATA mà cần để khởi động phiên mã chính xác, có hoặc không trình tự hộp CCAAT) và các yếu tố điều hòa bổ trợ (tức là trình tự hoạt hóa nằm trước, vùng tăng cường và vùng bất hoạt) mà biến đổi biểu hiện gen theo đáp ứng với kích thích phát sinh và/hoặc kích thích từ bên ngoài, hoặc theo cơ chế đặc hiệu mô. Thuật ngữ nêu trên cũng

được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự điều hòa phiên mã của gen ở sinh vật nhân sơ cổ, bao gồm trình tự hộp -35 và/hoặc trình tự điều hòa phiên mã hộp -10. Thuật ngữ "yếu tố điều hòa" cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ phân tử dung hợp tổng hợp hoặc dẫn xuất mà tạo ra, hoạt hóa hoặc tăng cường biểu hiện phân tử axit nucleic ở tế bào, mô hoặc cơ quan. Hơn nữa, thuật ngữ "yếu tố điều hòa" cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ các trình tự vùng kết thúc phiên mã nằm sau. Vùng kết thúc phiên mã là một đoạn của trình tự axit nucleic mà đánh dấu đầu tận cùng gen hoặc operon trong ADN bộ gen trong quá trình phiên mã. Vùng kết thúc phiên mã được sử dụng để biểu hiện gen của thực vật đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, gen cấu trúc theo sáng chế có vùng khởi đầu và trình tự vùng kết thúc.

Thuật ngữ "vùng khởi đầu của thực vật" được dùng trong bản mô tả để chỉ yếu tố điều hòa, mà điều hòa biểu hiện đoạn trình tự mang mã di truyền trong tế bào thực vật. Theo đó, vùng khởi đầu của thực vật không nhất thiết phải có nguồn gốc từ thực vật, mà có thể có nguồn gốc từ virut hoặc vi sinh vật, ví dụ từ virut mà tấn công tế bào thực vật. Thuật ngữ "vùng khởi đầu của thực vật" cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ vùng khởi đầu có thể có nguồn gốc từ tế bào thực vật, ví dụ từ thực vật mà được chuyển gen với trình tự axit nucleic được biểu hiện trong phương pháp theo sáng chế. Điều này cũng áp dụng cho "tín hiệu điều hòa khác của thực vật", như "vùng kết thúc của thực vật". Vùng khởi đầu nằm trước trình tự nucleotit hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế có thể được cải biến bằng một hoặc nhiều đột biến thay thế, chèn và/hoặc loại bỏ nucleotit mà không ảnh hưởng đến chức năng hoặc hoạt tính của vùng khởi đầu, khung đọc mã mở (ORF) hoặc vùng điều hòa đầu 3' như vùng kết thúc hoặc vùng điều hòa đầu 3' nằm cách xa khung đọc mã mở. Ngoài ra, hoạt tính của vùng khởi đầu có thể được cải thiện bằng cách cải biến trình tự của nó, hoặc vùng khởi đầu này được thay thế hoàn toàn bằng vùng khởi đầu có hoạt tính mạnh hơn, thậm chí là vùng khởi đầu có nguồn gốc từ sinh vật khác loài. Để biểu hiện ở thực vật, phân tử axit nucleic nêu trên phải được liên kết điều khiển với hoặc chứa vùng khởi đầu thích hợp mà biểu hiện gen ở thời điiểm chính xác với cấu trúc không gian biểu hiện cần thiết. Thuật ngữ "được liên kết điều khiển" được dùng trong bản mô tả để chỉ mối liên kết chức năng giữa trình tự vùng khởi đầu và gen quan tâm, sao cho trình tự vùng khởi đầu có khả năng hoạt hóa phiên mã gen quan tâm.

Các vùng khởi đầu sau có thể được chọn theo sáng chế nhưng không chỉ giới hạn ở các vùng khởi đầu này.

Thuật ngữ "vùng khởi đầu cấu trúc" được dùng trong bản mô tả để chỉ vùng khởi đầu có hoạt tính phiên mã trong hầu hết các giai đoạn sinh trưởng phát triển và điều kiện môi trường, nhưng không nhất thiết phải ở toàn bộ các giai đoạn và điều kiện này, ở ít nhất một tế bào, mô hoặc cơ quan. Ví dụ về vùng khởi đầu cấu trúc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở actin, HMGP, CaMV19S, GOS2, xyclophilin của lúa, histon H3 của ngô, histon H3 của cỏ linh lăng, 34S FMV, tiểu đơn vị kích cỡ nhỏ rubisco, OCS, SAD1, SAD2, nos, V-ATPaza, vùng khởi đầu có ái lực rất mạnh, protein hộp-G và vùng khởi đầu tổng hợp.

Thuật ngữ "vùng khởi đầu có ái lực mạnh" được dùng trong bản mô tả để chỉ vùng khởi đầu dẫn đến làm tăng hoặc biểu hiện quá mức gen. Ví dụ về vùng khởi đầu có ái lực mạnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CaMV-35S, CaMV-35Somega, ubiquitin UBQ1 của cây Mù tạc, ubiquitin của lúa, actin, hoặc vùng khởi đầu mã hóa rượu đehyđrogenaza 1 của ngô (Adh-1).

Theo phương án ưu tiên, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu cấu trúc mà là vùng khởi đầu có ái lực mạnh và điều khiển biểu hiện quá mức gen quan tâm để liên kết điều khiển với nó. Tốt hơn nếu, vùng khởi đầu là CaMV-35S, CaMV-35Somega và ubiquitin UBQ1 của cây Mù tạc.

Thuật ngữ "biểu hiện tăng" hoặc "biểu hiện quá mức" được dùng trong bản mô tả để chỉ dạng biểu hiện bất kỳ tạo ra mức độ biểu hiện tăng cho thực vật đối chứng, ví dụ thực vật thể dại.

Theo một phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe. Sự biểu hiện đặc hiệu mô libe có thể quan trọng cho chức năng của OsNRT2.3b, do mô mạch có vai trò quan trọng để điều hòa độ pH và gần đây đã phát hiện thấy rằng vận chuyển nitrat trong mô libe xuất hiện ở thực vật và có thể là quá trình quan trọng để phân bố nitơ đến chồi.

Ví dụ về vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe là RSS1P, có nguồn gốc từ gen mã hóa sucroza synthaza ở cây lúa (tương ứng với SEQ ID NO.5 hoặc biến thể chức năng hoặc một đoạn của nó, tham khảo Saha et al). Các vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe khác đã biết trong lĩnh vực này.

Theo các khía cạnh khác nhau của sáng chế, khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ cao hơn so với thực vật đối chứng. Thực vật đối chứng là thực vật không được biến nạp axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó, tốt hơn nếu thực vật đối chứng là thực vật thể dại. Tốt hơn nếu, thực vật đối chứng là cùng loài với thực vật chuyển gen. Hơn nữa, thực vật đối chứng có thể chứa các cải biến di truyền, bao gồm các cải biến biểu hiện các gen chuyển khác.

Thuật ngữ "tăng", "cải thiện" hoặc "tăng cường" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả. Mức tăng khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ nằm trong khoảng từ 5% đến 50%, ví dụ ít nhất bằng 5%, 6%, 7%, 8%, 9% hoặc 10%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 15% hoặc 20%, tốt hơn nữa nếu 25%, 30%, 35%, 40%, 45% hoặc 50% hoặc cao hơn so với thực vật đối chứng. Tốt hơn nếu, khả năng sinh trưởng được đánh giá bằng cách đo chiều dài trụ dưới lá mầm hoặc chiều dài thân. Theo một phương án, mức tăng năng suất ít nhất bằng 40%.

Axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó có thể cũng chứa gen chỉ thị chọn lọc tạo điều kiện thuận lợi cho việc chọn lọc các thực vật chuyển gen, như gen chỉ thị kháng kháng sinh, ví dụ kanamycin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen có năng suất, khả năng sinh trưởng, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước: biến nạp và biểu hiện ở thực vật hoặc tế bào thực vật trình tự axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen có năng suất, khả năng sinh trưởng, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước: biến nạp và biểu

hiện ở thực vật hoặc tế bào thực vật trình tự axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Phương này còn bao gồm bước tái sinh thực vật chuyển gen từ thực vật hoặc tế bào thực vật sau bước a), trong đó thực vật chuyển gen này chứa axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa và thu được thực vật thế hệ sau có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, trong đó thực vật thế hệ sau này cũng có năng suất, khả năng sinh trưởng, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên không bao gồm cây lúa, axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc biến thể chức năng hoặc một đoạn của nó.

Do đó, theo các khía cạnh khác nhau của sáng chế, axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được chèn vào thực vật và biểu hiện dưới dạng gen chuyển. Trình tự axit nucleic được chèn vào thực vật này nhờ quá trình chuyển gen. Thuật ngữ "chèn" hoặc "chuyển gen" được dùng trong bản mô tả để chỉ quá trình chuyển polynucleotit vào tế bào vật chủ, phương pháp tương ứng được sử dụng để chuyển gen. Mô thực vật có khả năng nhân giống vô tính tiếp theo, cho dù bằng cách phát sinh cơ quan hoặc tạo phôi, có thể được chuyển gen với axit nucleic theo sáng chế và toàn bộ thực vật được tái sinh từ đó. Mô cụ thể được chọn sẽ thay đổi phụ thuộc vào hệ nhân giống vô tính có sẵn và thích hợp nhất cho các loài cụ thể cần chuyển gen. Ví dụ về mô đích bao gồm đĩa lá, phấn hoa, phôi, lá mầm, trụ dưới lá mầm, thể giao tử cái, mô sẹo, mô phân sinh đang phát triển (ví dụ, mô phân sinh đỉnh, chồi nách, và mô phân sinh rễ), và mô phân sinh cảm ứng (ví dụ, mô phân sinh lá mầm và mô phân sinh trụ dưới lá mầm). Polynucleotit có thể được chèn tạm thời hoặc ổn định vào tế bào vật chủ và có thể được duy trì không tích hợp, ví dụ, dưới dạng plasmit. Theo cách khác, it có thể được tích hợp vào bộ gen của vật chủ. Sau đó, tế bào thực vật chuyển gen thu được có thể được sử dụng để tái sinh thực vật chuyển gen theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Quá trình chuyển gen ngoại sinh vào bộ gen của thực vật được gọi là quá trình chuyển gen. Quá trình chuyển gen thực vật hiện là kỹ thuật được sử dụng phổ biến ở nhiều loài. Tốt hơn nếu, phương pháp chuyển gen bất kỳ có thể được sử dụng để chèn gen quan tâm vào tế bào gốc thích hợp. Phương pháp để chuyển gen và tái sinh thực vật từ mô thực vật hoặc tế bào thực vật có thể được sử dụng để chuyển gen tạm thời hoặc ổn định. Phương pháp chuyển gen bao gồm phương pháp sử dụng liposom, phương pháp xung điện, phương pháp hóa học làm tăng hấp thu ADN tự do, phương pháp tiêm trực tiếp ADN vào thực vật, phương pháp súng bắn gen, phương pháp chuyển gen bằng virut hoặc phấn hoa và phương pháp vi tiêm. Phương pháp chuyển gen có thể được chọn từ phương pháp chuyển gen lục lạp bằng canxi/polyetylen glycol, phương pháp xung điện chuyển gen lục lạp, phương pháp vi tiêm vào vật chất di truyền của thực vật, phương pháp bắn phá hạt ADN hoặc ARN, phương pháp tiêm với virut (không tích hợp) và phương pháp tương tự. Tốt hơn nếu, thực vật chuyển gen, bao gồm cây trồng chuyển gen được tạo ra bằng phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium tumefaciens*.

Để chọn lọc thực vật chuyển gen, vật chất di truyền của thực vật thu được trong quá trình chuyển gen được đưa vào các điều kiện chọn lọc sao cho thực vật chuyển gen có thể phân biệt được với thực vật chưa chuyển gen. Ví dụ, hạt thu được theo phương pháp nêu trên có thể được gieo trồng và, sau giai đoạn sinh trưởng ban đầu, được chọn lọc thích hợp bằng phương pháp phun. Ngoài ra, nếu cần sau khi khử trùng các hạt được sinh trưởng trên đĩa thạch bằng chất chọn lọc thích hợp sao cho chỉ hạt đã chuyển gen có thể sinh trưởng thành thực vật. Theo cách khác, thực vật chuyển gen này được sàng lọc về sự có mặt của gen chỉ thị có thể chọn lọc như mô tả nêu trên. Sau khi chuyển ADN và tái sinh, thực vật chuyển gen giả định có thể cũng được đánh giá, ví dụ bằng phương pháp phân tích thấm tách Southern, về sự có mặt của gen quan tâm, số lượng bản sao và/hoặc cơ quan bộ gen. Theo cách khác, mức độ biểu hiện của ADN mới được chèn vào có thể được kiểm soát bằng phân tích thấm tách Northern và/hoặc Western đã biết trong lĩnh vực này.

Thực vật chuyển gen được tạo ra có thể được nhân giống bằng nhiều phương pháp, như bằng kỹ thuật nhân giống vô tính hoặc kỹ thuật nhân giống truyền thống. Ví dụ, thực vật chuyển gen thế hệ một (hoặc T_1) có thể được tự sinh trưởng và các thực vật chuyển gen đồng hợp tử thế hệ hai (hoặc T_2) được chọn lọc, sau đó thực vật thế hệ T_2 có thể tiếp tục được nhân giống bằng các kỹ thuật nhân giống truyền thông. Cơ quan chuyển

gen được tạo ra có thể tồn tại ở nhiều dạng. Ví dụ, cơ quan chuyển gen được tạo ra có thể ở dạng thể khảm của tế bào chuyển gen và tế bào chưa chuyển gen; thể biến nạp đơn dòng (ví dụ, toàn bộ các tế bào chuyển gen để chứa cat-xet biểu hiện); thể cấy ghép của mô chuyển gen và mô chưa chuyển gen (ví dụ, ở thực vật, thân rễ chuyển gen được cấy ghép với cành chưa chuyển gen).

Theo các khía cạnh khác nhau, sáng chế đề cập đến tế bào thực vật bất kỳ hoặc thực vật bất kỳ được sản xuất hoặc thu được bằng phương pháp bất kỳ theo sáng chế, và toàn bộ các bộ phận của thực vật và phôi mầm của chúng trừ khi có quy định khác. Ví dụ, theo một số khía cạnh nêu trên, thực vật này không phải là lúa. Do đó, phương pháp không bao gồm các phương án, trong đó axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc đoạn chức năng của biến thể của nó được biểu hiện ở giống lúa. Sáng chế cũng đề cập đến thế hệ sau của tế bào, mô, cơ quan cấp một đã chuyển gen hoặc toàn bộ thực vật được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ nêu trên, yêu cầu duy nhất là thế hệ sau có cùng đặc tính kiểu gen và/hoặc kiểu hình như cây mẹ trong phương pháp theo sáng chế.

Thực vật theo sáng chế, khác biệt ở chỗ có khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ phận thu hoạch của thực vật theo sáng chế như nêu trên như, nhưng không chỉ giới hạn ở hạt, lá, quả, hoa, thân, rễ, củ, thân củ và búp. Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm thu được, tốt hơn nếu thu được trực tiếp từ bộ phận thu hoạch của thực vật này, như hạt khô hoặc bột khô, dầu, chất béo và axit béo, tinh bột hoặc protein.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó để cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc khả năng vận chuyển nitơ của thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thực vật này không phải là cây lúa. Ngoài ra, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó để cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng

nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc khả năng vận chuyển nitơ của thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa.

Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng được liên kết điều khiển với vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, ví dụ axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5. Ngoài ra, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng axit nucleic này trong các phương pháp theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào thực vật, tốt hơn nếu tế bào thực vật hoặc tế bào *Agrobacterium tumefaciens*, biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng được liên kết điều khiển với vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào thực vật, tốt hơn nếu tế bào thực vật hoặc tế bào *Agrobacterium tumefaciens* biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng được liên kết điều khiển với vùng khởi đầu cấu trúc. Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến môi trường nuôi cấy chứa tế bào thực vật được phân lập hoặc tế bào *Agrobacterium tumefaciens* biểu hiện axit nucleic theo sáng chế.

Trừ khi thực vật này không phải là cây lúa, thì thực vật chuyển gen theo sáng chế có thể là thực vật một lá mầm hoặc thực vật hai lá mầm bất kỳ tạo ra các phương án theo sáng chế.

Thực vật hai lá mầm có thể được chọn từ các họ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở *Asteraceae*, *Brassicaceae* (ví dụ *Brassica napus*), *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae, Leguminosae* (*Caesalpiniaceae*, *Aesalpiniaceae*, *Mimosaceae*, *Papilionaceae* hoặc *Fabaceae)*, *Malvaceae*, *Rosaceae* hoặc *Solanaceae.* Ví dụ, thực vật có thể được chọn từ rau diếp, hướng dương, mù tạc, bông cải xanh, cải bó xôi, dưa hấu, bí, cải bắp, cà chua, khoai tây, khoai mỡ, ớt, thuốc lá, bông, mướp, táo, hoa hồng, dâu tây, cỏ linh lăng, đậu đỏ, đậu tương, đậu răng ngựa, đậu Hà Lan, đậu lăng, lạc, đậu hồi, mơ, lê, đào, nho hoặc thực vật họ chanh. Theo một phương án, thực vật này là cải dầu.

Thực vật theo sáng chế cũng bao gồm các cây trồng dùng để sản xuất nhiên liệu sinh học và năng lượng sinh học như cải dầu/hạt cải dầu, mía đường, lúa miến ngọt, *Panicum virgatum* (cỏ kê), hạt lanh, đậu lupin và cây liễu, cây dương, cây dương lai, cỏ voi hoặc thực vật hạt trần, như thông cành nhỏ. Thực vật theo sáng chế cũng bao gồm các

cây trồng dùng làm thức ăn cho gia súc (ngô), chăn thả gia súc hay thức ăn gia súc (cỏ hòa thảo, cỏ ba lá, cây hồng đậu, cỏ linh lăng), lấy sợi (ví dụ bông, cây lanh), vật liệu xây dựng (ví dụ thông, sồi), lấy thịt quả (ví dụ cây dương), nguyên liệu cho công nghiệp hóa chất (ví dụ hạt cải chứa nhiều axit béo erucic mạch dài, hạt lanh) và dùng cho mục đích vui chơi giải trí (ví dụ cỏ roi ngựa dùng cho sân gôn), cây cảnh dùng cho vườn công cộng và tư nhân (ví dụ cây hoa mõm chó, cây dã yên thảo, hoa hồng, cây phong lữ, Nicotiana sp.) và thực vật cho hoa và hoa đã hái dùng trang trí nhà cửa (hoa violet châu Phi, thu hải đường, hoa cúc, cây phong lữ, cây dây nhện, cây huyết dụ, cây sung cao su).

Thực vật một lá mầm có thể được chọn từ các họ *Arecaceae, Amaryllidaceae* hoặc *Poaceae*. Ví dụ, thực vật có thể là cây ngũ cốc, như lúa mỳ, lúa mạch, ngô, yến mạch, lúa miến, lúa mạch đen, kê, lúa mạch, cỏ roi ngựa, cỏ lúa mạch, mía hoặc các loài cỏ đuôi trâu, hoặc cây trồng như hành tây, tỏi tây, khoai mỡ hoặc chuối. Theo một phương án, thực vật này không phải là cây lúa.

Tốt hơn nếu, thực vật này là cây lương thực. Thuật ngữ "cây lương thực" được dùng trong bản mô tả để chỉ thực vật bất kỳ được trồng trên quy mô lớn để dùng cho người hoặc động vật.

Tốt nhất nếu, thực vật này là ngô, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, thuốc lá cà chua, thuốc lá, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương.

Theo một phương án, thực vật này là lúa mỳ. Theo một phương án, thực vật này là thuốc lá. Tốt hơn nếu, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe như mô tả trong sáng chế.

Thuật ngữ "thực vật" được dùng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ thực vật, thực vật gốc và thế hệ sau của thực vật và bộ phận thực vật, bao gồm hạt, quả, chồi, thân, lá, rễ (bao gồm thân củ), hoa, mô và cơ quan, trong đó mỗi bộ phận này chứa gen/axit nucleic quan tâm. Thuật ngữ "thực vật" cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ tế bào thực vật, dịch nuôi cấy, mô sẹo, phôi, vùng mô phân sinh, thể giao tử, thể bào tử, phấn hoa và vi bào tử, trong đó mỗi bộ phận này chứa gen/axit nucleic quan tâm.

Thực vật hoặc bộ phận của nó thu được bằng phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen như nêu trên cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Do đó, theo khía cạnh này, sáng chế không bao gồm cây lúa chuyển gen biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1. Theo một phương án, các thực vật khác có khả năng sinh trưởng trên NH_4 dưới dạng nguồn nitơ duy nhất cũng được loại trừ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe ở thực vật. Thực vật này có thể là thực vật một lá mầm hoặc thực vật hai lá mầm, bao gồm cây lúa. Theo một phương án, thực vật này không phải là cây lúa

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó thực vật này không phải là cây lúa. Theo một phương án, thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1.

Thực vật này khác biệt ở chỗ có năng suất, khả năng sinh trưởng, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện.

Liên quan đến trình tự SEQ ID NO.1 hoặc trình tự khác, thuật ngữ "biến thể chức năng của trình tự axit nucleic" được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự biến thể gen hoặc một đoạn trình tự gen vẫn có chức năng sinh học của trình tự hoàn toàn không đột biến, ví dụ có khả năng sinh trưởng hoặc năng suất tăng khi được biểu hiện ở thực vật chuyển gen. Biến thể chức năng cũng bao gồm biến thể của gen quan tâm có trình tự được cải biến nhưng không ảnh hưởng đến chức năng, ví dụ ở các gốc không bảo thủ. Thuật ngữ "biến thể chức năng của trình tự axit nucleic" cũng được dùng trong bản mô tả để chỉ biến thể có hoạt tính sinh học gần như giống hệt, tức là chỉ có một vài biến đổi, ví dụ ở các gốc không bảo thủ, so với các trình tự thể dại như được thể hiện trong sáng chế.

Do đó, liên quan đến trình tự SEQ ID NO.1 hoặc trình tự khác, sáng chế cũng bao gồm đoạn chức năng của trình tự axit nucleic theo sáng chế vẫn có chức năng sinh học của trình tự hoàn toàn không đột biến, ví dụ có khả năng sinh trưởng hoặc năng suất tăng khi được biểu hiện ở thực vật chuyển gen.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các khía cạnh của sáng chế bao gồm phương pháp và sử dụng không chỉ axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, mà còn bao gồm các biến thể chức năng hoặc các đoạn gen của SEQ ID NO.1 mà không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học và chức năng của protein thu được. Tuy nhiên, các biến đổi trên trình tự axit nucleic mà tạo ra axit amin khác ở vị trí nhất định sẽ không ảnh hưởng đến chức năng của polypeptit được mã hóa, đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, bộ ba mã hóa cho axit amin alanin, là axit amin kỵ nước, có thể được thay thế bằng bộ ba mã hóa cho gốc axit amin khác có tính kỵ nước thấp hơn, như glyxin, hoặc gốc axit amin có tính kỵ nước cao hơn, như valin, leucin, hoặc isoleucin. Tương tự, các biến đổi thay một gốc axit amin tích điện âm bằng một gốc axit amin khác, như axit aspartic thay bằng axit glutamic, hoặc một gốc axit amin tích điện dương bằng một gốc axit amin khác, như lysin thay bằng arginin, cũng có thể được thực hiện để tạo ra sản phẩm có chức năng tương đương. Nucleotit làm biến đổi các đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của phân tử polypeptit sẽ không được sử dụng để biến đổi hoạt tính của the polypeptit. Mỗi cải biến được đề xuất là đã biết trong lĩnh vực này như khi xác định sự duy trì hoạt tính sinh học của sản phẩm được mã hóa.

Biến thể chức năng của SEQ ID NO.1 có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1. Biến thể chức năng của SEQ ID NO.3 có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3. Biến thể chức năng này vẫn chứa cấu trúc cảm biến độ pH.

Gen tương đồng chức năng của SEQ ID NO.1 là axit nucleic mã hóa peptit NRT2.3b có hoạt tính sinh học giống như SEQ ID NO.1, nói cách khác gen tương đồng chức năng này có năng suất hoặc khả năng sinh trưởng tăng. Thuật ngữ gen tương đồng chức năng bao gồm các gen tiến hóa thẳng của OsNRT2.3b ở các loài thực vật khác.

Polypeptit tương đồng của polypeptit OsNRT2.3b để cải thiện thứ tự ưu tiên có độ tương đồng ít nhất bằng 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3. Tốt hơn nếu, độ tương đồng trình tự tổng cộng bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Theo một phương án khác, trình tự axit nucleic OsNRT2.3b để cải thiện thứ tự ưu tiên có độ tương đồng ít nhất bằng 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO.1. Tốt hơn nếu, độ tương đồng trình tự tổng cộng bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Độ tương đồng trình tự tổng cộng bằng được xác định bằng thuật toán sắp thẳng hàng đã biết trong lĩnh vực này, như thuật toán Needleman Wunsch trong chương trình GAP (GCG Wisconsin Package, Accelrys).

Tốt hơn nếu, gen tương đồng/gen tiến hóa thẳng của OsNRT2.3b có cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI nằm ở phía bào tương. Theo một phương án, polypeptit tương đồng của polypeptit OsNRT2.3b có độ tương đồng tổng cộng bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và chứa cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16). Các biến thể chức năng hoặc các đoạn của các gen tương đồng này, ví dụ các gen tương đồng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6-SEQ ID NO.15, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Fig.24 là hình vẽ thể hiện gen tương đồng/gen tiến hóa thẳng có cấu trúc cảm biến độ pH được xác định trong OsNRT2.3b. Do đó, tốt hơn nếu gen tiến hóa thẳng hoặc peptit tiến hóa thẳng được sử dụng theo các khía cạnh khác nhau của sáng chế được chọn từ các gen tiến hóa thẳng được liệt kê trong Fig.24, bao gồm lúa mạch, ngô, đậu tương, cỏ dứa dại (SEQ ID NO.6-SEQ ID NO.15) và lúa mỳ. Các biến thể của các trình tự này có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc

99% so với các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6-SEQ ID NO.15 cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các gen tương đồng hoặc gen tiến hóa thẳng thích hợp có thể được xác định bằng cách so sánh trình tự và xác định các vùng bảo thủ. Chức năng của gen tương đồng hoặc gen tiến hóa thẳng có thể được xác định như mô tả trong sáng chế và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể kiểm chứng được chức năng của các gen này khi iểu hiện ở thực vật.

Ví dụ, theo các khía cạnh khác nhau của sáng chế, axit nucleic mã hóa peptit NRT2.3 nội sinh có thể được biểu hiện ở thực vật bất kỳ như được mô tả trong sáng chế trừ khi có quy định khác bằng phương pháp tái tổ hợp. Như nêu trên, theo một số khía cạnh cụ thể của sáng chế khi khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa. Ví dụ, OsNRT2.3b của lúa có thể được biểu hiện ở giống lúa và NRT2.3b của lúa mỳ có thể được biểu hiện ở cây lúa mỳ.

Theo một phương án khác, axit nucleic mã hóa peptit NRT2.3b ở thực vật mà là nội sinh đối với loài thực vật thứ nhất có thể được biểu hiện ở thực vật thứ hai bằng phương pháp tái tổ hợp. Ví dụ, thể tương đồng của OsNRT2.3b từ một thực vật khác có thể được biểu hiện ở giống lúa.

Theo một phương án ưu tiên theo sáng chế, OsNRT2.3b có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc biến thể chức năng của nó được biểu hiện ở một thực vật khác mà không phải là cây lúa. Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng sự biểu hiện OsNRT2.3b tạo ra kiểu hình có lợi cho các thực vật khác mà sử dụng nguồn nitơ khác. Ví dụ, OsNRT2.3b có thể được biểu hiện ở thực vật một lá mầm hoặc thực vật hai lá mầm như mô tả trong sáng chế. Theo một phương án, thực vật này là lúa mỳ hoặc thuốc lá.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện một hoặc nhiều tính trạng của thực vật bao gồm khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng hấp thu nitơ, làm giảm khả năng quang hô hấp, làm tăng lượng CO_2 nội bào, làm tăng hiệu suất quang hợp, khả năng chống chịu dịch bệnh và duy trì/cải thiện cân bằng pH nội mô, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, hoặc biến thể chức năng của nó ở một thực vật khác mà không phải là cây lúa. Thực vật chuyển gen không phải lúa biểu hiện axit

nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, hoặc biến thể chức năng, bộ phận của nó cũng nằm trong phạm vi của sáng chế ví dụ, lúa mỳ hoặc thuốc lá.

Thực vật và gen nội sinh NRT2.3b của nó có thể được chọn từ thực vật bất kỳ, như từ một trong số các họ hoặc loài được liệt kê trong sáng chế.

Mù tạc không có gen tương đồng với OsNRT2.3, gen tương đồng nhất là AtNRT2.5, nhưng gen này không chứa cấu trúc cảm biến độ pH giống như OsNRT2.3but. Khía cạnh quan trọng của hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện liên quan đến OsNRT2.3b là độ nhạy pH của chức năng vận chuyển nitrat. Cấu trúc cảm biến độ pH bào tương ở OsNRT2.3b, mà không có ở OsNRT2.3a, tạo ra mối liên kết giữa nguồn dinh dưỡng nitơ và điều hòa độ pH. Do đó, sự có mặt của cấu trúc cảm biến độ pH có vai trò quan trọng đối với gen tương đồng/gen tiến hóa thẳng ở các loài khác.

Do đó, gen tương đồng/gen tiến hóa thẳng của OsNRT2.3b có thể được xác định bằng sự có mặt của cấu trúc cảm biến độ pH bào tương. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định OsNRT2.3b gen tương đồng/gen tiến hóa thẳng ở các loài khác bao gồm bước xác định peptit chứa cấu trúc cảm biến độ pH bào tương.

Như được mô tả trong các ví dụ thực hiện sáng chế, khi biểu hiện quá mức OsNRT2.3 ở giống lúa, độ pH mô gỗ bằng 7 và 7,3 ở giống lúa thể dại lần lượt được bón với nitrat và amoni, trong khi đó độ pH mô gỗ bằng 7,5 và 7,6-7,8 ở các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, cao hơn đáng kể so với giống lúa thể dại. Sau 24 giờ bón phân đạm, dịch mô libe được thu gom. Độ pH ở dịch mô libe được đo và độ axit thấp được phát hiện ở các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b. Sự khác biệt giữa giống lúa thể dại và các giống lúa biểu hiện quá mức là khoảng 0,2 đơn vị độ pH khi bón phân nitrat và khoảng 0,1 đơn vị độ pH khi bón phân amoni. Độ pH dịch mô libe ở giống lúa thể dại đã giảm từ 7,8 đến 6,1 và độ pH dịch mô libe ở giống lúa b-S6 đã giảm từ 6,7 đến 6,0 sau 24 giờ đến 48 giờ bón phân nitrat; trong khi đó khi bón phân amoni, độ pH dịch mô libe ở giống lúa thể dại đã giảm từ 7,4 đến 6,3 và độ pH dịch mô libe ở giống lúa b-S6 đã giảm từ 6,6 đến 5,9 từ 24 giờ đến 48 giờ. Sự khác biệt đáng kể giữa giống lúa thể dại và giống lúa b-S6 xuất hiện sau 24 giờ, tuy nhiên sự khác biệt đáng kể không xuất hiện sau 48 giờ. Khi bón phân amoni, mặc dù độ pH dịch mô libe ở giống lúa thể dại cao hơn so với giống lúa b-S6, nhưng sự khác biệt này là không đáng kể. Mức độ axit hóa dịch mô libe ở giống lúa thể dại khi bón phân nitrat là khoảng 1,7 đơn vị độ pH, tuy nhiên mức độ axit hóa

dịch mô libe chỉ bằng 0,7 đơn vị độ pH ở giống lúa b-S6. Sau 48 giờ dịch mô sáp thu gom được được điều chỉnh độ pH để thu được các trị số tương đương hơn đối với cây lúa thể dại và b-S6 thực vật (Fig.17b). Hơn nữa, độ pH không bào ở rễ ở giống lúa thể dại và b-S6 rễ được đo bằng chất chỉ thị tím bromcresol[17] sau 72 giờ bón phân đạm với liều lượng khác nhau. Giống lúa biểu hiện quá mức b-S6 có độ pH kiềm khi bón phân nitrat và mức độ axit hóa khi bón phân amoni so với giống lúa thể dại, trong khi đó độ pH trong môi trường nước không có sự khác biệt đáng kể giữa giống lúa thể dại và giống lúa b-S6 trong cùng khoảng thời gian (Fig.18c) do thể tích môi trường đủ lớn để làm cân bằng độ pH ở bề mặt rễ.

Đã biết rằng dạng phân đạm cung cấp cho thực vật ảnh hưởng đến cân bằng pH ở thực vật[24]. Quá trình đồng hóa amoni tạo ra ít nhất một H^+ từ một NH_4^+; trong khi đó quá trình đồng hóa NO_3^- tạo ra nhiều nhất một OH^- từ một NO_3^- [4]. Ion H^+ hoặc ion OH^- cần được tạo ra với lượng dư để duy trì độ pH bào tương được bộc lộ ra khỏi tế bào trong bước tiếp nhận năng lượng (ví dụ bơm H^+ ATPaza ở màng sinh chất)[4,10]. Độ pH của dịch mô libe từ các giống lúa sinh trưởng trong điều kiện nghèo nitơ được bón nitrat hoặc amoni được so sánh. Việc bón nitrat và amoni đã làm axit hóa độ pH của dịch mô libe của giống lúa thể dại và các giống lúa chuyển gen (Fig.3d, và Fig.3e). Điều ngạc nhiên là, mức độ axit hóa ở mô libe của 4 giống lúa chuyển gen thấp hơn đáng kể so với cây lúa thể dại (Fig.3d, và Fig.3e) mặc dù không có sự khác biệt đang kể về nồng độ nitrat có thể được phát hiện ở mô libe (dữ liệu không được thể hiện). Các dữ liệu này cho thấy các giống lúa chuyển gen có khả năng điều hòa độ pH dịch mô libe tốt hơn. Hơn nữa, sự khác biệt về độ pH dịch mô libe giữa giống lúa thể dại và các giống lúa chuyển gen (Fig.17a, b) có thể giải thích cho việc P và Fe được tích tụ nhiều hơn ở lá của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b (Fig.19). Dịch mô libe có tính axit hơn (Fig.17) sẽ có lợi cho việc vận chuyển P và Fe vào lá[25]. Tương tự, khả năng hấp thu nitơ được tăng cường cũng là yếu tố quan trọng để cải thiện khả năng sinh trưởng và năng suất thực vật.

Đã được ghi nhận rằng mức độ axit hóa bào tương đã làm bất hoạt quá trình vận chuyển nước qua kênh vận chuyển nước ở tế bào trứng ếch Xenopus[26]. Hơn nữa, do quá trình đồng hóa nitrat phụ thuộc vào quá trình hô hấp[27], nên mối tương quan[4,28] giữa quá trình đồng hóa nitrat, amoni và quá trình hô hấp được kết hợp chặt chẽ với hệ thống vận chuyển malat giữa tế bào chất và lục lạp để cân bằng độ pH[29].

Ở thực vật, quá trình điều hòa độ pH cần được diễn ra vì nhiều lý do. Lý do cơ bản nhất là nước tự ion hóa dẫn đến proton không được loại bỏ hoàn toàn ra khỏi dung dịch nhất định. Không giống như các ion khác, proton có thể được tiêu thụ hoặc tạo ra trong một số phản ứng hóa học, kết quả là đến mức độ nhất định các chất dinh dưỡng có thể khiến cho proton trở thành vấn đề trở ngại, hoặc thậm chí gây nguy hiểm cho sinh vật. Các yếu tố điều hòa chính xác và hệ quả rất khó phân tích (ở thời điểm nhất định) trong mọi tình huống do pH ảnh hưởng đến một loạt các quá trình ở mô và tế bào thực vật và các khoang nội bào, và đồng thời hoạt độ H^+ có thể được biến đổi bởi cùng các quá trình. Khả năng đảo ngược nhiễu loạn độ pH, cũng như mức độ và tốc độ ở đó khả năng này xảy ra, xác định chất lượng của quá trình điều hòa độ pH.

Việc duy trì cân bằng nội mô của độ pH bào tương có vai trò quan trọng để tạo ra năng lượng cho sự hấp thu của tế bào và dự trữ các chất dinh dưỡng và các chất chuyển hóa thứ cấp do các hệ thống vận chuyển liên hợp proton điều hòa các quá trình này của tế bào. Građien độ pH giữa các khoang tế bào và môi trường bên ngoài tạo ra nguồn năng lượng cho các quá trình quan trọng này. Do đó, nhiều quá trình quan trọng của tế bào được tăng cường bởi cân bằng pH nội mô được cải thiện cùng với việc bón hỗn hợp phân đạm nitrat và amoni.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng OsNRT2.3b chứa cấu trúc cảm biến độ pH trong phần bào tương của màng sinh chất mà không có mặt ở OsNRT2.3a trong phần bào tương. Cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16) nằm gần gốc histiđin 167 của OsNRT2.3b hướng về phía bào tương của màng sinh chất là đặc tính thường thấy ở họ trao đổi anion, mà được tìm thấy ở nhiều sinh vật khác nhau bao gồm động vật có vú, do đó có ý nghĩa về mặt sinh học hơn. Như được kiểm chứng trong các ví dụ thực hiện sáng chế, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng sau khi đột biến một gốc axit amin duy nhất (H167R), OsNRT2.3b làm mất chức năng điều hòa độ pH của bào tương, ngay cả sau khi bón phân nitrat nhiều lần (Fig.5b).

Cấu trúc cảm biến của OsNRT2.3b điều hòa độ pH bào tương ở thực vật.

Các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện thấy rằng cấu trúc cảm biến độ pH của OsNRT2.3b có vai trò quan trọng cho các tác dụng này ở giống lúa bằng cách liên hợp trạng thái độ pH của lúa với dạng nitrat được bón vào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều hòa cân bằng pH nội mô, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật. Theo một phương án, thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm mức độ axit hóa trong thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật. Theo một khía cạnh, thực vật này không phải là cây lúa.

Mức độ axit hóa có thể được giảm ít nhất khoảng 0,1 đơn vị độ pH, ví dụ 0,1, 0,2. 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 hoặc cao hơn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp biến đổi khả năng vận chuyển nitrat và cân bằng pH nội mô của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa ở thực vật, trong đó axit nucleic này chứa đột biến ở cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16). Thể đột biến này thể hiện cấu trúc cảm biến độ pH phi chức năng.

Như được thể hiện trong bản mô tả này, trình tự điều hòa có thể là vùng khởi đầu cấu trúc như mô tả trong sáng chế hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô. Theo một phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe như mô tả trong sáng chế.

Thuật ngữ thực vật cũng được định nghĩa trong bản mô tả. Tốt hơn nếu, thực vật này là cây lương thực. Tốt nhất nếu, thực vật này là ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, thuốc lá, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương. Theo một phương án, thực vật này không phải là cây lúa.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng, một đoạn hoặc thể tương đồng của nó chứa cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16) để điều hòa độ pH ở thực vật chuyển gen.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện năng suất của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng vận chuyển nitrat của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng hấp thu nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một phương án của các phương pháp khác nhau theo sáng chế để cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng hấp thu nitơ và/hoặc vận chuyển nitrat, các tính trạng này tăng trong các điều kiện khắc nghiệt, ví dụ điều kiện nghèo nitơ.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo khả năng chống chịu điều kiện nghèo nitơ của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo khả năng chống chịu dịch bệnh của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2. Khi thực vật này là lúa, thì dịch bệnh này có thể là bệnh héo vàng, bệnh đốm lá nhỏ và bệnh rỉ sọc.

Do đó, theo các phương pháp nêu trên, trình tự điều hòa theo phương pháp và thực vật nêu trên như mô tả trong sáng chế có thể là vùng khởi đầu cấu trúc như mô tả trong sáng chế, vùng khởi đầu cảm ứng hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô. Theo một phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe như mô tả trong sáng chế. Sự biểu hiện đặc hiệu mô libe có thể quan trọng cho chức năng của OsNRT2.3b, do mô mạch có vai trò quan trọng để điều hòa độ pH và gần đây đã phát hiện thấy rằng sự vận chuyển nitrat trong mô libe xuất hiện ở thực vật và có thể là quá trình quan trọng để phân bố nitơ đến chồi.

Thuật ngữ thực vật cũng được định nghĩa trong bản mô tả. Tốt hơn nếu, thực vật này là cây lương thực. Tốt nhất nếu, thực vật này là ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương. Theo một phương án, thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện khả năng sử dụng nitơ, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, hiệu suất nitơ, khả năng chống chịu điều kiện nghèo nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng hấp thu nitơ và/hoặc vận chuyển nitrat của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc có trình tự như nêu trong có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, đoạn chức năng hoặc biến thể của nó được liên kết điều khiển với vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe ở thực vật. Thuật ngữ thực vật cũng được định nghĩa trong bản mô tả. Tốt hơn nếu, thực vật này là cây lương thực. Tốt nhất nếu, thực vật này là ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương. Theo một phương án, thực vật này không phải là cây lúa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen having năng suất, khả năng sinh trưởng và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước: biến nạp và biểu hiện ở thực vật hoặc tế bào thực vật axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Phương này còn bao gồm bước tái sinh thực vật chuyển gen từ thực vật hoặc tế bào thực vật sau bước a), trong đó thực vật chuyển gen chứa axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa và thu được thực vật thế hệ sau có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, trong đó thực vật thế hệ sau này có năng suất, khả năng sinh trưởng và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện. Các phương pháp này được thực hiện như được mô tả trong bản mô tả này.

Thực vật hoặc bộ phận của nó thu được bằng phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen như nêu trên cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, biểu hiện axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Thực vật có thể được sử dụng theo phương pháp của sáng chế được liệt kê cụ thể trong bản mô này nhưng cũng bao gồm lúa. Tốt hơn nếu, thực vật này là cây lương thực hoặc thực vật dùng để sản xuất nhiên liệu sinh học như được mô tả trong sáng chế.

Tốt nhất nếu, thực vật này là lúa, ngô, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, thuốc lá, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương.

Theo một phương án, thực vật này là lúa mỳ và vùng khởi đầu là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe như mô tả trong sáng chế. Theo một phương án, thực vật này là thuốc lá và vùng khởi đầu là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe như mô tả trong sáng chế.

Khác biệt ở chỗ, thực vật này có năng suất, khả năng sinh trưởng, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện.

Các mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết từ phần mô tả này và bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trong khi phần nêu trên tạo ra phần mô tả chung cho đối tượng nằm trong phạm vi của sáng chế, bao gồm các phương pháp, sản xuất và sử dụng sáng chế này cũng như các phương án tốt nhất của chúng, thì các ví dụ sau được đề xuất để tiếp tục cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thực hiện sáng chế này và tạo ra phần mô tả hoàn chỉnh của nó. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế, phạm vi của sáng chế cần được hiểu từ bộ yêu cầu bảo hộ và các phần tương đương của nó được thể hiện trong phần mô tả này. Các khía cạnh và phương án khác của sáng chế sẽ hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi xem xét bản mô tả này. Cần hiểu rằng các ví dụ này không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Toàn bộ các tài liệu bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm các tài liệu tham khảo, cơ sở dữ liệu về trình tự gen hoặc protein, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn

Thuật ngữ "và/hoặc" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một trong hai dấu hiệu hoặc thành phần với hoặc không với dấu hiệu kia. Ví dụ "A và/hoặc B" được dùng trong bản mô tả để chỉ mỗi thành phần (i) A, (ii) B và (iii) A và B, cũng như khi mỗi thành phần này được tách riêng.

Trừ khi có quy định khác, phần mô tả và định nghĩa các dấu hiệu như nêu trên không bị giới hạn bởi khía cạnh hoặc phương án cụ thể bất kỳ của sáng chế và áp dụng chung cho tất cả các khía cạnh và phương án được mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết trong các ví dụ không giới hạn sau

1. Quá trình biểu hiện axit nucleic OsNRT2.3a và axit nucleic OsNRT2.3b ở cây lúa.

Nguyên liệu và phương pháp.

Thiết kế vectơ biểu hiện quá mức và cây lúa chuyển gen.

Các khung đọc mã mở của axit nucleic OsNRT2.3a và axit nucleic OsNRT2.3b được khuếch đại bằng các đoạn mồi đặc hiệu gen. Các mảnh gen này được xử lý với các enzym cắt giới hạn và chèn vào vectơ và giải trình tự trước khi chuyển gen. Mô sẹo phôi của lúa (*Oryza sativa*) được biến nạp bằng phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*[33]. Một cây lúa thế hệ T_0 đã chuyển gen được thu nhận và sinh trưởng để tạo ra giống lúa thế hệ T_1. Các cây lúa thế hệ T_1 đồng hợp tử được trồng để tạo ra các cây lúa thế hệ T_2. Hai giống lúa thế hệ T_2 biểu hiện quá mức OsNRT2.3a, a-U1 và a-U2 và 4 giống lúa thế hệ T_2 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, b-U1, b-U2, b-S2 và b-S6 được sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo. Các thử nghiệm trên đồng ruộng với các cây lúa thế hệ T_2 được thực hiện ở trại thử nghiệm Changxing thuộc Đại học Zhejiang (05/2010 đến 10/2010) với 4 lượng phân bón ure là 0, 75, 150 và 300kg N/ha. Các hạt được gieo vào ngày 05/05 các cây mạ của mỗi giống lúa được cấy vào 3 hàng mỗi hàng 33 cây với khoảng cách giữa các hàng là 25cm và khoảng cách giữa các cây là 20cm vào ngày 05/06. Các cây lúa được sinh trưởng trong các thửa ruộng (Fig.23a và Fig.23b) được bón phân đạm một cách ngẫu nhiên ở mỗi liều lượng. Đối với thử nghiệm trên quy mô lớn ở liều lượng phân đạm bằng 75kg N/ha, các cây lúa được cấy vào 10 hàng mỗi hàng 128 cây (Fig.23d). Ba lô ruộng lặp lại được sử dụng cho toàn bộ các thử nghiệm trên đồng ruộng và các thửa ruộng được thu hoạch cuối vụ vào ngày 10/10. Tình trạng dinh dưỡng của đất trong trại thử nghiệm này là lượng nitơ tổng số (N): 1,00 ± 0,18mg/g, lượng phospho tổng số (P): 0,38 ± 0,08mg/g, lượng kali tổng số (K): 39 ± 2,3mg/g, P Olsen (0,5mM $NaHCO_3$-lượng P hòa tan): 23 ± 4,1mg/kg và độ pH của đất là 6,3 ± 0,47 (n = 6). Phân lân ở liều lượng 60kg P (dưới dạng $Ca(H_2PO_4)_2$)/ha và phân kali ở liều lượng

10kg K (dưới dạng K_2SO_4)/ha được bón vào ruộng ngập nước trước khi cấy các cây mạ. Phân đạm được bón lần thứ nhất trước khi cấy vào ngày 03/06 và 20% lượng phân đạm tổng số được trộn vào đất. Phân đạm được bón lần thứ hai với lượng 40% phân đạm tổng số vào ngày 12/06 khi cây lúa bắt đầu đẻ nhánh. Phân đạm được bón lần cuối cùng với lượng 40% phân đạm tổng số vào ngày 20/06. Thời gian sinh trưởng tại trại thử nghiệm Changxing là 120 ± 3 ngày đối với cây lúa thể dại, giống lúa a-U1 và giống lúa a-U2, và 130 ± 2 ngày ở hàm lượng nitơ nằm trong khoảng từ 0 đến 75kh/ha, 135 ± 2 ngày ở hàm lượng nitơ bằng 150kg/ha và 140 ± 2 ngày ở hàm lượng nitơ bằng 300kg/ha đối với các giống lúa b-U1, b-U2, b-S2 và b-S6. Năng suất hạt được đo ở giai đoạn thu hoạch và hiệu suất sử dụng nitơ được tính theo công thức: năng suất hạt/lượng phân đạm đã bón. Để đánh giá mức độ hấp thu ^{15}N, các thử nghiệm thu gom dịch mô gỗ và dịch mô libe, các điều kiện sinh trưởng trong muôi trường nước được sử dụng như được mô tả trong tài liệu tham khảo[34] trên môi trường nuôi cấy IRRI ở độ pH = 5,5 có bổ sung nguồn nitơ là 1,25mM NH_4NO_3 trừ khi có quy định khác. ARN ở rễ được chiết tách để phân tích PCR định lượng.

Sản xuất kháng thể và thực hiện phân tích thấm tách Western.

Các trình tự ADN bổ sung có chiều dài đầy đủ của gen OsNRT2.3a và gen OsNRT2.3b được khuếch đại từ các plasmit của OsNRT2.3a (AK109776) và OsNRT2.3b (AK072215) bằng các đoạn mồi xuôi: GGAATTCTCACACCCCGGCCGG (SEQ ID NO.17), mồi ngược: CGGGATCCATGTGGGGC GGCATGCTC (SEQ ID NO.18). Các plasmit này do Dr.Kikuchi cung cấp (KOME). Mảnh sản phẩm PCR được tách dòng cấp hai vào vectơ biểu hiện vi khuẩn pGSX (Amersham) ở các vị trí BamH I và EcoR I. Các sản phẩm axit amin được tinh chế và các kháng thể đơn dòng của chúng được tổng hợp[35]. Kháng thể đơn dòng được chọn từ 192 phản ứng đặc hiệu tế bào riêng biệt đối với protein OsNRT2.3a (516 aa) hoặc OsNRT2.3b (486 aa). Quá trình phân tách protein màng bào tương và phân tích thấm tách Western được thực hiện lặp lại hai lần theo phương pháp như được mô tả trong các tài liệu tham khảo[10,14].

Quá trình lai hóa tại chỗ ARN.

Quá trình lai hóa tại chỗ ARN được thực hiện theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu tham khảo[36]. Đối với mẫu dò OsNRT2.3b, vị trí gắn kết là ở đoạn không dịch mã đầu 5' đặc hiệu OsNRT2.3b có trình tự là CGATGGTTGGGTGCGGCGAGA

(SEQ ID NO.19). Trình tự không được dùng làm khuôn là GCTACCAACCCACGCCGCTCT (SEQ ID NO.20). Toàn bộ các mẫu dò được đánh dấu ở đầu 5' bằng DIG.

Định lượng hàm lượng ^{15}N ở rễ.

Các cây mạ thể dại và các cây mạ biểu hiện quá mức được sinh trưởng trên môi trường dung dịch dinh dưỡng IRRI chứa 1,25mM NH_4NO_3 trong hai tháng trong nhà kính, sau đó được bón ít phân đạm trong 3 ngày. Các cây lúa được rửa bằng dung dịch $CaSO_4$ 0,1mM trong 1 phút, sau đó chuyển vào dung dịch chứa 1,25mM $Ca(^{15}NO_3)_2$ (% nguyên tử ^{15}N: 99,27%) hoặc $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (% nguyên tử ^{15}N: 95,7%) hoặc $^{15}NH_4NO_3$ (% nguyên tử ^{15}N: 45%) hoặc $NH_4{}^{15}NO_3$ (% nguyên tử ^{15}N: 45,25%) hoặc $^{15}NH_4{}^{15}NO_3$ (% nguyên tử ^{15}N: 95,5%) trong 5 phút và rửa lần cuối bằng dung dịch $CaSO_4$ 0,1mM trong 1 phút. Các rễ được tách khỏi chồi ngay sau khi chuyển vào dung dịch $CaSO_4$ lần cuối cùng, và để đông lạnh trong nitơ lỏng. Sau khi nghiền, bột rễ được sấy đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 70°C. Bột rễ của mỗi mẫu cây (10mg) được phân tích bằng hệ thống MAT253-Flash EA1112-MS (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Toàn bộ thử nghiệm được lặp lại hai lần mỗi lần với 5 mẫu lặp lại.

Thu gom dịch mô gỗ và dịch mô libe.

Các cây mạ được sinh trưởng trong 1,25mM NH_4NO_3 trong 8 tuần, sau đó chuyển sang bón phân đạm (nitrat: 1,25mM $Ca(NO_3)_2$; amoni: 1,25mM $(NH_4)_2SO_4$) trong 24 giờ sau đó cắt ở đoạn rễ có chiều dài lớn hơn 4cm. Phần bên dưới dung dịch nitơ là để thu gom dịch mô gỗ[34] và phần bên trên dung dịch nitơ là để thu gom dịch mô libe[16].

Dịch mô libe được thu gom bằng cách đặt mỗ chồi lúa vào ống thủy tinh có dung tích 50mL chứa 15mL dung dịch EDTA-Na_2 25mM được phủ bằng màng parafin. Chồi lúa được luồn qua màng parafin và dịch mô libe được thu gom trong 24 giờ. Sự thay đổi độ pH mô libe được đo bằng máy đo pH (kiểu 868, Thermo Orion, USA) và tính toán bằng sự khác biệt về độ pH ở các mẫu ở thời điểm bắt đầu và kết thúc của quá trình thu gom dịch mô libe. Thử nghiệm này được thực hiện với 5 mẫu lặp lại và được lặp lại hai lần.

Dịch mô libe của cùng các giống nêu trên cũng được thu gom bằng phương pháp sử dụng rầy nâu. Mỗi cây lúa được đặt vào chai dung tích 250mL chứa dung dịch dinh dưỡng với 6 cây được đặt trong buồng côn trùng ở nhiệt độ 26°C và 16 giờ chiếu sáng.

Bảy đến mười rầy nâu trưởng thành được chuyển nhiễm vào mỗi cây khi bắt đầu bón phân đạm. Dịch mô libe tiết ra bởi rầy nâu được thu gom sau 24 giờ, 48 giờ bón phân đạm (Fig.17).

Quá trình sản xuất tế bào trứng của ếch Xenopus, tiêm ARN thông tin, thử nghiệm đánh giá mức độ hấp thu ^{15}N và thử nghiệm điện sinh lý.

Quá trình sản xuất tế bào trứng của ếch Xenopus, tiêm ARN thông tin, thử nghiệm đánh giá mức độ hấp thu ^{15}N-nitrat và thử nghiệm điện sinh lý được thực hiện theo cách thức được mô tả trong tài liệu tham khảo[37-39]. 0,5mM $Na^{15}N$-NO_3 hoặc ^{15}N-NH_4Cl trong ND96 được sử dụng trong thử nghiệm đánh giá mức độ hấp thu ^{15}N trong 16 giờ[38]. Vi điện cực chọn lọc pH được sử dụng để đo độ pH bào tương[18].

Thể đột biến điểm OsNRT2.3b và tổng hợp ARN thông tin của thể đột biến điểm này.

Thể đột biến điểm (H167R) của *OsNRT2.3b* được tạo ra bằng phương pháp PCR. Thể đột biến này được tạo ra bởi hai mảnh PCR của *OsNRT2.3b* với điểm đột biến và vị trí cắt giới hạn mới trên các đoạn mồi. ADN bổ sung *OsNRT2.3b* trên plasmit pT7Ts được sử dụng làm khuôn ADN và mảnh PCR thứ nhất (H167RB) được tách dòng cấp hai vào vị trí HindIII và XbaI của plasmit pT7Ts. Plasmit mới và mảnh PCR thứ hai (H167R) được phân cắt bởi Csp45 I và Xba I và nối thành plasmit cuối cùng chứa ADN bổ sung *OsNRT2.3b* được đột biến điểm H167R (pH167R). ARN thông tin của pH167R được tổng hợp theo phương pháp được mô tả nêu trên.

Quá trình tổng hợp ARN và lai hóa trên chip ADN.

Ba mẫu chồi lặp lại của mỗi giống lúa thể dại (Nipponbare), giống lúa a-U1 và giống lúa b-S6 được thu nhận từ thửa ruộng được bón 150kg N/ha ở trại thử nghiệm Changxing vào 10:00 sáng ngày 01/08, tức là ở giai đoạn đẻ nhánh mạnh nhất của toàn bộ các cây lúa. Các mẫu mô chồi dùng để tách chiết ARNA được đông lạnh nhanh ở nhiệt độ -80°C trong niơ lỏng ngay trong quá trình thu nhận. Quá trình chiết tách ARN, lai hóa với chip gen Affymetrix đặc hiệu cho lúa (Santa Clara, CA, USA), phân tích dữ liệu và giải trình tự được thực hiện theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu tham khảo[40].

Phương pháp PCR định lượng.

ARN tổng số từ ba mẫu sinh học, đặc biệt là từ rễ và chồi của các giống lúa thể dại và giống lúa chuyển gen, được phân lập bằng thuốc thử TRIzol theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)[13].

Đánh giá hiệu suất trao đổi khí và đốt cháy CO_2 sau khi tiếp xúc với ánh sáng.

Hiệu suất quang hợp khi được chiếu sáng đầy đủ của các lá cờ ở cây lúa được đo từ 9:00 giờ đến 15:00 giờ bằng hệ thống quang hợp mở di động Li-Cor 6400 ở các cây lúa được bón 150kg N/ha ở trại thử nghiệm Changxing vào cùng ngày lấy mẫu để phân tích bằng chip gen. Nhiệt độ lá trong quá trình đo được giữ ở nhiệt độ 27,0°C ± 0,1°C với cường độ dòng lượng tử ánh sáng quang hợp (PPFD) bằng 1500μmol lượng tử ánh sáng m^{-2}.giây^{-1} như được mô tả trong tài liệu tham khảo[41]. Nồng độ CO_2 môi trường trong cóng đo (Ca-c) được điều chỉnh theo nồng độ CO_2 trong không khí (Ca) (417 ± 1,0μmol CO_2 mol^{-1}), và độ ẩm tương đối được giữ ở nhiệt độ 20%. Dữ liệu được đo khi đạt đến trạng thái cân bằng ổn định (10 phút).Các lá đã đo được đánh dấu, và diện tích lá được tính toán dựa trên diện tích là đã đánh dấu. Hiệu suất đốt cháy CO_2 sau khi tiếp xúc với ánh sáng (PIB) được đo ở cùng lá đã đánh dấu trong các điều kiện hô hấp (bão hòa PPFD và bằng 1,500μmol lượng tử ánh sáng m^{-2}.giây^{-1}, nồng độ CO_2 trong cóng đo bằng 100μmol CO_2 mol^{-1}, độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 60% đến 70%) như được mô tả trong tài liệu tham khảo[22].

Kết quả thử nghiệm.

Khả năng sinh trưởng của các cây lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được cải thiện.

Các tác giả sáng chế đã sản xuất thành công giống lúa (Oryza sativa L ssp. Japonica, giống Nipponbare) biểu hiện quá mức OsNRT2.3a và axit nucleic OsNRT2.3b bằng phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, sử dụng vùng khởi đầu ubiquitin hoặc vùng khởi đầu 35S (Fig.1a và Fig.1b). Các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3a được đặt tên là a-U1 và a-U2, các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được đặt tên là b-U1, b-U2, b-S2 và b-S6, với một bản sao copy gen chèn. Điều ngạc nhiên là, các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, mà đã được kiểm chứng ở cả mức độ phiên mã lẫn hàm lượng protein (Fig.1c và Fig.1d), có khả năng sinh trưởng cao hơn giống lúa thể dại (Fig.1a và Fig.1b). Sinh khối rơm rạ và chiều dài bông lúa của các giống lúa biểu hiện quá mức cao hơn giống lúa thể dại (Fig.11; Bảng 2 và Bảng 3). Do kích cỡ thân cấp một

và thân cấp hai tăng, nên tổng số lượng hạt/bông lúa cao hơn giống lúa thể dại (Fig.11, Bảng 2). Trái lại, các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3a không có sự khác biệt về các tính trạng so với giống lúa thể dại cho dù mức độ biểu hiện ARN thông tin OsNRT2.3a và hàm lượng protein tăng ở các giống lúa chuyển gen này (Fig.1c và Fig.1d, Fig.11). Kết quả lai tại chỗ cho thấy rằng ARN thông tin OsNRT2.3b ở lá của giống lúa b-S6 được biểu hiện quá mức ở tế bào biểu bì, mô libe và tế bào diệp lục khi so với giống lúa thể dại (Fig.1e). Hơn nữa, khi OsNRT2.3b được biểu hiện quá mức ở các giống lúa khác có năng suất và hiệu suất sử dụng nio cao, ví dụ giống lúa WYJ7 có xuất xứ từ miền Nam Trung Quốc và giống lúa YF47 có xuất xứ từ miền Bắc Trung Quốc, thì năng suất hạt và hiệu suất sử dụng nitơ của chúng (năng suất hạt chia cho lượng phân đạm được bón) cũng tăng đáng kể (Fig.12 và Fig.13).

Thử nghiệm trên đồng ruộng các giống lúa biểu hiện quá mức có năng suất hạt và hiệu suất sử dụng nitơ tăng ở cả điều kiện khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới và các liều lượng phân đạm khác nhau.

Dựa trên kiểu hình ổn định của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b trong các chậu đất ngập nước, các tác giả sáng chế đã gieo trồng chọn lọc các giống lúa chuyển gen Nipponbare, WYJ7, YF47 và các giống lúa thể dại của chúng trên 4 thử nghiệm để đánh giá đặc tính của chúng ở các liều lượng phân đạm khác nhau.

Bốn giống lúa Nipponbare chuyển gen thế hệ T_2 và giống lúa thể dại được gieo trồng và bón phân đạm với 4 liều lượng khác nhau trên cánh đồng lúa (độ pH của đất = 6,3) ở trại thử nghiệm Changxing trong vùng khí hậu cận nhiệt đới (Fig.2). So với cây lúa thể dại, sinh khối rơm rạ, số lượng hạt/bông lúa, tỷ lệ chín, năng suất hạt và hiệu suất sử dụng nitơ của các giống lúa chuyển gen đã tăng đáng kể ở toàn bộ các liều lượng phân đạm được bón (Fig.2a-Fig.2c, Bảng 5). Mức tăng năng suất hạt trung bình nằm trong khoảng từ 33% ở liều lượng 75kg N/ha đến 25% ở liều lượng 300kg N/ha. Năng suất hạt của các giống lúa biểu hiện quá mức axit nucleic được bón phân đạm với liều lượng 150kg N/ha cao hơn năng suất hạt của giống lúa thể dại được bón phân đạm với liều lượng 300kg N/ha từ 6% đến 13% (Fig.2b). Đặc biệt là, năng suất hạt của giống lúa b-S6 được bón phân đạm với liều lượng 75kg N/ha là tương đương với năng suất hạt của giống lúa thể dại được bón phân đạm với liều lượng 300kg N/ha (Fig.2b, Bảng 5). Hiệu suất sử dụng nitơ của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b nằm trong khoảng từ 68 đến

79 g/g N ở liều lượng phân đạm bằng 75kg N/ha, so với 55 g/g N ở giống lúa thể dại (Fig.2c). Trong thử nghiệm quy mô lớn trên đồng ruộng được bón 75kg N/ha, năng suất và hiệu suất sử dụng nitơ của giống lúa b-U2 cao hơn năng suất và hiệu suất sử dụng nitơ của giống lúa thể dại 30,5%; đồng thời năng suất và hiệu suất sử dụng nitơ của giống lúa b-S6 cũng cao hơn năng suất và hiệu suất sử dụng nitơ của giống lúa thể dại 40,5% (Fig.2d, Fig.2e, và Fig.2f).

Trong thử nghiệm thứ hai, các cây lúa thế hệ T5 của các giống lúa b-S2 và b-S6 được gieo trồng ở trại thử nghiệm Hải Nam trong vùng khí hậu nhiệt đới (Fig.14a). Năng suất hạt và hiệu suất sử dụng nitơ của các giống lúa này cũng tăng đáng kể. Sự khác biệt lớn nhất giữa các giống lúa chuyển gen và giống lúa thể dại Nipponbđược thể hiện ở liều lượng phân đạm bằng 110kg N/ha (Fig.14b). Hơn nữa, quá trình lai chéo giống lúa b-S6 thể hệ T_5 với giống lúa thể dại đã kiểm chứng được rằng kiểu hình của giống lúa b-S6 hoàn toàn được tạo ra bởi sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b như ở các cây lúa thế hệ F_2, kiểu gen aa được di truyền cho giống lúa thể dại và kiểu gen AA giống như b-S6 (Fig.15).

Trong thử nghiệm thứ ba, các giống lúa WYJ7 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được trồng và bón phân đạm với liều lượng 110kg N/ha và 220kg N/ha ở trại thử nghiệm Changxing. Trong số 4 giống lúa WYJ7 chuyển gen (thể hệ T_2), năng suất hạt cao hơn năng suất hạt của giống lúa thể dại từ 35% đến 51% ở liều lượng phân đạm bằng 110kg N/ha và từ 38% đến 42% ở liều lượng phân đạm bằng 220kg N/ha. Hiệu suất sử dụng nitơ trung bình cao hơn hiệu suất sử dụng nitơ trung bình của giống lúa thể dại 43% (Fig.12f).

Trong thử nghiệm thứ tư, các giống lúa YF47 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được trồng ở tỉnh Hải Nam, Trung Quốc (Fig.15). Tương tự kết quả thu được trong hai thử nghiệm nêu trên, các giống lúa YF47 biểu hiện quá mức OsNRT2.3b có sinh khối rơm rạ cao hơn và năng suất hạt cao hơn năng suất hạt của giống lúa thể dại 39% ở liều lượng phân đạm thông thường (150kg/ha) (Fig.13a, và Fig.13d). Tóm lại, sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b tạo ra năng suất hạt và hiệu suất sử dụng nitơ đều tăng ở các giống lúa, điều kiện khí hâu, và liều lượng phân đạm khác nhau.

Ở giống lúa Nipponbare biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, giai đoạn trổ bông diễn ra chậm hơn so với cây lúa thể dại là 15 ± 2 ngày ở liều lượng phân đạm bằng 150kg/ha

và 20 ± 2 ngày ở liều lượng phân đạm bằng 300kg/ha (Fig.2a, Fig.2d, Fig.16, Bảng 1). Trong các thử nghiệm trồng trong chậu với các giống lúa này, sau 120 ngày gieo hạt, năng suất hạt của giống lúa b-S2 và b-S6 cao hơn năng suất hạt của giống lúa thể dại 37% và 40% (Fig.16g). Sau 140 ngày, năng suất hạt của giống lúa b-S2 và b-S6 cao hơn năng suất hạt của giống lúa thể dại 55% và 49% (Fig.16g). Khoảng thời gian kéo dài thêm 20 ngày này chỉ làm tăng năng suất hạt của giống lúa b-S2 và b-S6 bằng 18% và 9% so với năng suất hạt sau 120 ngày đầu tiên. Rõ ràng lá sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b ảnh hưởng đến năng suất hạt mạnh nhất sau 120 ngày. Hơn nữa, khoảng thời gian kéo dài thêm 20 ngày này hầu như cũng không làm tăng mức độ hấp thu nitơ của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b (Fig.16h). Tuy nhiên, khoảng thời gian kéo dài thêm 20 ngày này đã làm tăng tỷ lệ sinh khối rơm rạ và tốc độ chuyển hóa nitơ thành hạt (Bảng 3 và Bảng 4) và hiệu suất sử dụng nitơ (đồng hóa) (NUtE) từ 33g hạt/g nitơ sau 120 ngày (gần như không khác biệt so với giống lúa thể dại) đến 39,1-40,2g hạt/g nitơ sau 140 ngày (cao hơn đáng kể giống lúa thể dại đối với giống lúa b-S2 và b-S6 (Fig.16i). Trên thực tế, ở các giống lúa WYJ7 và YF47, giai đoạn trổ bông không diễn ra chậm hơn so với giống lúa thể dại.

Sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đã làm tăng mức độ hấp thu nitrat, vận chuyển đến chồi, độ pH mô gỗ, cân bằng pH nội mô ở mô libe, tích tụ P và Fe ở lá.

Ảnh hưởng của sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đến mức độ hấp thu ^{15}N-nitrat ở bốn giống lúa chuyển gen Nipponbđược gieo trồng trong điều kiện ngập nước ở độ pH = 6,0 (Fig.3a). Tốc độ hấp thu nitrat đã tăng đáng kể ở toàn bộ các giống lúa chuyển gen so với cây lúa thể dại (Fig.3a), điều này chứng tỏ rằng hoạt tính của axit nucleic OsNRT2.3b đã tăng ở các giống lúa này. Trái lại, sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b không ảnh hưởng đáng kể đến mức độ hấp thu ^{15}N-amoni trong thời gian ngắn (Fig.3a).

Hàm lượng nitrat và amoni ở mô gỗ của các giống lúa b-U1, b-U2, b-S2 và b-S6 lần lượt cao hơn và thấp hơn so với cây lúa thể dại khi bón phân nitrat (Fig.3b). Độ pH mô gỗ bằng 7 và 7,3 ở giống lúa thể dại lần lượt được bón với nitrat và amoni, trong khi đó độ pH mô gỗ bằng 7,5 và 7,6-7,8 ở các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b, cao hơn đáng kể so với giống lúa thể dại. Sau 24 giờ bón phân đạm, dịch mô libe được thu gom. Độ pH ở dịch mô libe được đo bằng phương pháp thu gom EDTA-Na_2[16] và độ axit thấp được phát hiện ở các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b. Sự khác biệt giữa

giống lúa thể dại và các giống lúa biểu hiện quá mức là khoảng 0,2 đơn vị độ pH khi bón phân nitrat và khoảng 0,1 đơn vị độ pH khi bón phân amoni. Để kiểm chứng độ pH dịch mô libe bằng phương pháp khác, dịch mô libe được thu gom bằng phương pháp sử dụng rầy nâu (được mô tả trên Fig.9). Độ pH dịch mô libe ở giống lúa thể dại đã giảm từ 7,8 đến 6,1 và độ pH dịch mô libe ở giống lúa b-S6 đã giảm từ 6,7 đến 6,0 sau 24 giờ đến 48 giờ bón phân nitrat (Fig.9a); trong khi đó khi bón phân amoni, độ pH dịch mô libe ở giống lúa thể dại đã giảm từ 7,4 đến 6,3 và độ pH dịch mô libe ở giống lúa b-S6 đã giảm từ 6,6 đến 5,9 từ 24 giờ đến 48 giờ (Fig.9b). Sự khác biệt đáng kể giữa giống lúa thể dại và giống lúa b-S6 xuất hiện sau 24 giờ, tuy nhiên sự khác biệt đáng kể không xuất hiện sau 48 giờ. Khi bón phân amoni, mặc dù độ pH dịch mô libe ở giống lúa thể dại cao hơn so với giống lúa b-S6, nhưng sự khác biệt này là không đáng kể (Fig.9b). Mức độ axit hóa dịch mô libe ở giống lúa thể dại khi bón phân nitrat là khoảng 1,7 đơn vị độ pH, tuy nhiên mức độ axit hóa dịch mô libe chỉ bằng 0,7 đơn vị độ pH ở giống lúa b-S6 (Fig.3e). Sau 48 giờ, dịch mô sáp thu gom được được điều chỉnh độ pH để thu được các trị số tương đương hơn đối với cây lúa thể dại và b-S6 thực vật (Fig.9b). Hơn nữa, độ pH không bào ở rễ của giống lúa thể dại và giống lúa b-S6 được đo bằng chất chỉ thị tím bromcresol[17] sau 72 giờ bón phân đạm với liều lượng khác nhau. Giống lúa biểu hiện quá mức b-S6 có độ pH kiềm khi bón phân nitrat và mức độ axit hóa khi bón phân amoni so với giống lúa thể dại (Fig.18a, Fig.18b), trong khi đó độ pH trong môi trường nước không có sự khác biệt đáng kể giữa giống lúa thể dại và giống lúa b-S6 trong cùng khoảng thời gian (Fig.18c) do thể tích môi trường đủ lớn để làm cân bằng độ pH ở bề mặt rễ.

Khi bón phân amoni nitrat, thì nồng độ P và Fe tổng số ở các giống lúa cũng được đo. Nồng độ P và Fe tổng số ở lá của các giống lúa biểu hiện quá mức đều cao hơn so với cây lúa thể dại (Fig.19), đặc biệt là nồng độ Fe tổng số cao gấp từ 3 đến 6 lần so với giống lúa thể dại.

Sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đã làm tăng mức độ hấp thu nitơ tổng số khi bón hỗn hợp phân amoni và nitrat ở độ pH bằng 4 và độ pH bằng 6.

Các giống lúa được bón ít nitơ được bón bổ sung với $NH_4{}^{15}NO_3$ hoặc ${}^{15}NH_4NO_3$ hoặc ${}^{15}NH_4{}^{15}NO_3$ ở độ pH bằng 4 và độ pH bằng 6 trong 5 phút để đánh giá mức độ hấp thu nitơ bởi rễ (Fig.4). Các kết quả này cho thấy khi độ pH tăng, mức độ hấp thu ${}^{15}NO_3^-$

giảm, $^{15}NH_4^+$ và ^{15}N tổng số tăng đáng kể đối với cả giống lúa thể dại lẫn toàn bộ các giống lúa chuyển gen OsNRT2.3b (Fig.4a, Fig.4b, và Fig.4c). Các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b có mức độ hấp thu $^{15}NH_4NO_3$ và nitơ tổng số ở độ pH bằng 4 và độ pH bằng 6 tăng. Trong các thử nghiệm trên đồng ruộng, độ pH của đất nằm trong khoảng từ 4,4 đến 6,4 (Fig.1, Fig.2, Fig.13-Fig.14), kiểu hình của các giống lúa chuyển gen trồng trên đồng ruộng có thể được giải thích bằng khả năng hấp thu nitơ tổng số (nitrat và amoni) của các giống lúa này.

Chức năng vận chuyển của OsNRT2.3b được điều hòa bởi độ pH bào tương.

Do sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất sử dụng nitơ và khả năng sinh trưởng của lúa và tác dụng này liên quan đến cân bằng pH nội mô của thực vật, nên chức năng vận chuyển của axit nucleic OsNRT2.3b đã được kiểm chứng ở cấp độ phân tử. Trong các thử nghiệm biểu hiện không tương đồng, các thay đổi bởi nitrat theo điện thế màng của tế bào trứng ếch Xenopus biểu hiện OsNRT2.3b không thể đáp ứng với việc bổ sung nitrat liên tục (Fig.5a). Tế bào trứng của ếch Xenopus cần được nghỉ trong ít nhất 30 phút giữa các lần bổ sung nitrat để phục hồi đáp ứng điện thế hoặc có thể đáp ứng với nitrat ngay sau khi rửa bằng dung dịch nước muối có độ pH = 8,0 (Fig.5a). Kết quả đo bằng điện cực pH kép cho thấy rằng mức độ axit hóa của bào tương tăng 0,2 đơn vị đã ngăn ngừa đáp ứng lần thứ hai với nitrat của tế bào trứng ếch Xenopus được tiêm OsNRT2.3b (Fig.5a). Đáp ứng của độ pH bào tương xhuất hiện chậm hơn so với sự thay đổi điện thế màng theo nitrat được bổ sung vào từ bên ngoài (Fig.5a). Việc độ pH bào tương đáp ứng chậm hơn so với sự thay đổi điện thế màng được mô tả trong các tài liệu tham khảo[18,19].

Cấu trúc xuyên màng cấp hai đồng nhất của OsNRT2.3b được xác định bằng các phần mềm. Kết quả phân tích bằng 14 phần mềm cho thấy OsNRT2.3 có 11 cấu trúc xuyên màng cấp hai đồng nhất với đầu tận cùng N nằm trong bào tương và 5 cấu trúc xuyên màng cấp hai đồng nhất đầu tiên được thể hiện trong bảng dưới đây. Axit amin H 167 được xác định nằm trong bào tương trong cả bảng số liệu và hình vẽ, được thể hiện với thể đốt biến điểm đơn mục tiêu trong phần xác định cấu trúc cấp hai dưới đây, được xác định bởi http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/.). Cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI là nằm gần gốc histiđin 167 trong phần bào tương.

Điều ngạc nhiên là, kết quả phân tích tin sinh học cấu trúc protein OsNRT2.3b thu được cho thấy cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI[20] nằm gần gốc histiđin (H) của OsNRT2.3b hướng về phía bào tương của màng sinh chất nằm sau vị trí đột biến điểm (H167R), OsNRT2.3b làm mất chức năng điều hòa độ pH của bào tương, ngay cả sau khi bón phân nitrat nhiều lần (Fig.5b). Các kết quả này cho thấy rằng cơ chế cân bằng nội sinh độ pH nội mô của tế bào trứng ếch Xenopus có thể khôi phục độ pH bào tương cao hơn ngưỡng pH đối với hoạt tính vận chuyển của OsNRT2.3b. Khi tế bào trứng ếch Xenopus được ủ với ^{15}N-nitrat chỉ trong 4 giờ, tác dụng điều hòa của độ pH bào tương đến sự vận chuyển nitrat được thể hiện rõ nhất, khi so sánh dạng đột biến H167R và dạng thể dại của OsNRT2.3b cho thấy rằng đột biến này làm tăng tích tụ nitrat nhiều hơn (Fig.5c). Tuy nhiên, sau 8 giờ ủ đã không có sự khác biệt về hoạt tính của hai loại gen vận chuyển này; điều này chứng tỏ rằng sau khi ủ trong thời gian dài, nitrat đã được tích tụ tối đa trong tế bào trứng ếch Xenopus.

Giảm biểu hiện gen hô hấp và khả năng quang hô hấp.

Một số gen được biết là có liên quan đặc hiệu với hoạt tính hô hấp của thực vật [21]. Kết quả phân tích bằng chip gen và PCT định lượng về mức độ biểu hiện gen cho thấy rằng khả năng quang hô hấp đã được biến đổi ở giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3, khi so với cây lúa thể dại và các giống lúa biểu hiện quá mức axit nucelic OsNRT2.3a.

Hiệu suất quang hợp tổng số ở các giống lúa b-S2 và b-S6 cao hơn so với cây lúa thể dại, tuy nhiên hiệu suất quang hợp tổng số ở các giống lúa b-U1 và b-U2 hầu như không tăng. Tuy nhiên, nồng độ CO_2 nội bào tăng và khả năng quang hô hấp giảm ở toàn bộ các giống lúa biểu hiện quá mức so với cây lúa thể dại (Fig.20). Khả năng quang hô hấp giảm và tốc độ quang hợp tăng ở các giống lúa chuyển gen có thể giúp tạo ra nhiều sinh khối hơn[22]. Các kết quả này cho thấy rằng hiệu suất quang hợp tăng ở các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b góp phần tạo ra kiểu hình ổn định.

Kết luận.

Sự thay đổi hoạt tính cảm biến độ pH của OsNRT2.3b là một trong số các yếu tố chính để tạo ra kiểu hình của các giống lúa chuyển gen, khi biến nạp thể đột biến gen OsNRT2.3b H167R gen vào các cây lúa Nipponbare không làm tăng chiều cao, năng suất và làm chậm giai đoạn sinh sản (Fig.21). Cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16) nằm gần gốc histiđin 167 là đặc tính thường thấy ở họ trao đổi anion, mà được

tìm thấy ở nhiều sinh vật khác nhau bao gồm động vật có vú, do đó có ý nghĩa về mặt sinh học hơn[20]. Việc tăng độ pH môi trường bên ngoài đã làm giảm tích tụ nitrat ở tế bào trứng ếch Xenopus biểu hiện axit nucleic OsNRT2.3b (Fig.5d), điều này giúp khẳng định rằng OsNRT2.3b là gen đồng vận chuyển proton-nitrat[14]. Việc tăng độ pH môi trường bên ngoài đã làm giảm građien nồng độ proton điều khiển sự vận chuyển nitrat, nhưng ngược lại nó làm phục hồi chức năng vận chuyển nitrat của OsNRT2.3b bằng cách kiềm hóa môi trường bào tương hơn. Cả hai tác dụng này xuất hiện nhờ sự thay đổi độ pH, nhưng xảy ra trên các mặt khác nhau của màng sinh chất. Ở thực vật sự hấp thu đồng thời nitrat và amoni trái ngược với tác dụng điều hòa độ pH bào tương của cấu trúc cảm biến độ pH của OsNRT2.3b. Cơ chế đồng vận chuyển proton này là để vận chuyển nitrat vào tế bào tạo ra môi trường axit cho bào tương, trong khi đó sự vận chuyển amoni có thể tạo ra môi trường kiềm cho bào tương[23] mà có thể làm tăng vận chuyển đồng thời proton-nitrat. Tác dụng hiệp đồng tạm thời giữa vận chuyển amoni và nitrat để duy trì độ pH bào tương có thể giúp giải thích được việc tăng mức độ hấp thu ^{15}N-amoni khi các giống lúa được bón nguồn phân đạm hỗn hợp (Fig.4), và loại trừ khả năng có thể tự hấp thu amoni của protein OsNRT2.3b ở tế bào trứng ếch Xenopus (Fig.22). Ở giống lúa thể dại, mức độ biểu hiện OsNRT2.3b là thấp[13] và nằm chủ yếu trong mô libe của lá chứ không phải rễ (Fig.1d). Các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b được điều khiển bởi vùng khởi đầu có ái lực mạnh có mức độ biểu hiện ở mô cao hơn bình thường (Fig.1d). Tác dụng hiệp đồng giữa vận chuyển amoni và nitrat được cải thiện bằng cách biểu hiện quá mức gen vận chuyển cảm biến độ pH OsNRT2.3b ở tế bào rễ.

Đã biết rằng dạng phân đạm cung cấp cho thực vật ảnh hưởng đến cân bằng pH ở thực vật[24]. Quá trình đồng hóa amoni tạo ra ít nhất một H^+ từ một NH_4^+; trong khi đó quá trình đồng hóa NO_3^- tạo ra nhiều nhất một OH^- từ một NO_3^- [4]. Ion H^+ hoặc ion OH^- cần được tạo ra với lượng dư để duy trì độ pH bào tương được bộc lộ ra khỏi tế bào trong bước tiếp nhận năng lượng (ví dụ bơm H^+ ATPaza ở màng sinh chất)[4,10]. Sự biểu hiện đặc hiệu ở mô mạch của giống lúa thể dại cho thấy vai trò đặc hiệu của của OsNRT2.3b trong việc vận chuyển nitơ trên quãng đường dài trong thực vật. Để kiểm chứng giả thuyết này, độ pH của dịch mô libe từ các giống lúa sinh trưởng trong điều kiện nghèo nitơ được bón nitrat hoặc amoni được so sánh. Việc bón nitrat và amoni đã làm axit hóa độ pH của dịch mô libe của giống lúa thể dại và các giống lúa chuyển gen (Fig.3d, và Fig.3e). Điều ngạc nhiên là, mức độ axit hóa ở mô libe của 4 giống lúa chuyển gen thấp hơn đáng kể so với

cây lúa thể dại (Fig.3d, và Fig.3e) mặc dù không có sự khác biệt đang kể về nồng độ nitrat có thể được phát hiện ở mô libe (dữ liệu không được thể hiện). Các dữ liệu này cho thấy các giống lúa chuyển gen có khả năng điều hòa độ pH dịch mô libe tốt hơn, và đây là yếu tố quan trọng để cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ. Hơn nữa, sự khác biệt về độ pH dịch mô libe giữa giống lúa thể dại và các giống lúa chuyển gen (Fig.17a, b) có thể giải thích cho việc P và Fe được tích tụ nhiều hơn ở lá của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b (Fig.19). Dịch mô libe có tính axit hơn (Fig.17) sẽ có lợi cho việc vận chuyển P và Fe vào lá[25]. Tương tự, khả năng hấp thu nitơ được tăng cường cũng là yếu tố quan trọng để cải thiện khả năng sinh trưởng và năng suất thực vật.

Đã được ghi nhận rằng mức độ axit hóa bào tương đã làm bất hoạt quá trình vận chuyển nước qua kênh vận chuyển nước ở tế bào trứng ếch Xenopus[26]. Như được mô tả trong các tài liệu này và các tài liệu tham khảo khác[26], cho thấy độ pH bào tương có thể là yếu tố điều hòa quan trọng đối với cả gen mã hóa kênh vận chuyển nước và gen vận chuyển nitrat ở thực vật. Hơn nữa, do quá trình đồng hóa nitrat phụ thuộc vào quá trình hô hấp[27], nên mối tương quan[4,28] giữa quá trình đồng hóa nitrat, amoni và quá trình hô hấp được kết hợp chặt chẽ với hệ thống vận chuyển malat giữa tế bào chất và lục lạp để cân bằng độ pH[29].

Nhiều tính trạng quan trọng ở cây trồng như hiệu suất sử dụng nitơ đã được biết là các tính trạng được mã hóa bởi nhiều phức hợp gen[4]. Tuy nhiên, một số bài báo cho thấy sự thay đổi biểu hiện của một gen chuyển duy nhất có thể cải thiện đáng kể hiệu suất sử dụng nitơ của cây trồng[30-32]. Năng suất được cải thiện đáng kể của các giống lúa chuyển gen OsNRT2.3b trong các điều kiện đồng ruộng khác nhau mở ra triển vọng cải hiện hiệu suất sử dụng nitơ của cây lúa bằng cách biểu hiện quá mức một gen chuyển duy nhất. Sự kết hợp cân bằng pH và hiệu suất sử dụng nitơ có thể tạo ra cây trồng có đặc tính nổi trội hơn và tạo ra phương pháp hiệu quả để cải thiện hiệu suất sử dụng nitơ.

2. Biểu hiện OsNRT2.3b ở cây Mù tạc.

Dữ liệu biểu hiện bởi vùng khởi đầu 35S của OsNRT2.3b ở cây Mù tạc được thu nhận. Cây mù tạc được biến nạp bằng kỹ thuật chuyển gen nhúng chìm hoa nhờ *Agrobacterium* (Clough & Bent 1998). Trong các thử nghiệm sinh trưởng trên đĩa Petri, các cây Mù tạc được bón phân nitrat với hàm lượng bằng 0,2mM hoặc 6mM. Ba giống Mù tạc biểu hiện quá mức OsNRT2.3b (được kiểm chứng bằng cách đo hàm lượng ARN

thông tin bằng phương pháp PCR định lượng) được đánh giá và so sánh với các giống Mù tạc thể dại (Fig.6). Dữ liệu trên Fig.6 cho thấy ba giống Mù tạc biểu hiện quá mức gen vận chuyển nitrat OsNRT2.3b sinh trưởng trên nguồn nitrat ở hàm lượng 6mM có lượng sinh khối chồi cao hơn đáng kể (Fig.6A) và có chiều dài dễ ngắn hơn khi sinh trưởng trên nguồn nitrat ở hàm lượng 0,2mM (Fig.6B) so với giống Mù tạc thể dại. Hơn nữa, hai trong ba giống Mù tạc này tích tụ nitrat ở mô nhiều hơn.

Các giống Mù tạc này được sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy rất đơn giản trên đĩa thạch Petri với các chất dinh dưỡng được bổ sung vào thạch (tham khảo Orsel et al. 2006 để biết thêm chi tiết). Các thử nghiệm này sẽ được lặp lại bằng cách trồng các giống Mù tạc này trên chậu đất ngập nước để xác định và so sánh hiệu suất sử dụng nitơ giữa giống Mù tạc thể dại và các giống Mù tạc biểu hiện quá mức OsNRT2.3. Nguồn nitrat giàu ^{15}N sẽ được sử dụng trong các thử nghiệm trên đĩa Petri và trong các chậu đất ngập nước để xác định và so sánh mức độ hấp thu nitrat giữa các giống Mù tạc thể dại và các giống Mù tạc biểu hiện quá mức (tham khảo Orsel et al. 2006). Các giống Mù tạc sẽ được sinh trưởng và so sánh trên nguồn phân đạm hỗn hợp, gồm amoni nitrat hoặc nguồn phân đạm chỉ chứa nitrat.

3. Biểu hiện OsNRT2.3b ở cây thuốc lá.

Nguyên liệu và phương pháp:

Thiết kế vectơ biểu hiện quá mức và cây thuốc lá chuyển gen.

Các khung đọc mã mở của axit nucleic OsNRT2.3b được khuếch đại bằng các đoạn mồi đặc hiệu (Bảng 1). Các mảnh gen này được xử lý với enzym cắt hạn chế, chèn vào vectơ và giải trình tự trước khi chuyển gen. Mô sẹo phôi của giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* 89 được biến nạp bằng phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium* (Ai *et al.* 2009. Một cây thuốc lá thế hệ T_0 đã chuyển gen được thu nhận và sinh trưởng để tạo ra giống thuốc lá thế hệ T_1 (Fig.1). Các cây thuốc lá thế hệ T_1 đồng hợp tử được sử dụng để sản xuất các cây thuốc lá thế hệ T_2.

Phân tích thấm tách Southern.

Các giống thuốc lá chuyển gen có giá trị kinh tế thấp OsNRT2.3a, tức là các giống thuốc lá r1 và r2, được xác định bằng phân tích thấm tách Southern theo quy trình được mô tả trong bài báo Jia *et al.*, 2011.

Phân tích PCT bán định lượng.

ARN tổng số được tách chiết từ 100mg nguyên liệu cây thuốc là bằng thuốc Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nồng độ ARN tổng số được đo bằng máy quang phổ UV (Eppendorf, Biophotometer, Germany). ARN tổng số từ mỗi mẫu (2μg) được sử dụng để tổng hợp ADN bổ sung sợi đơn bằng enzym phiên mã ngược M-MLV (Fermentas, Foster City, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen đích được khuếch đại PCR bằng Taq ADN polymeraza (Fermentas, Foster City, CA, USA) với các đoạn mồi đặc hiệu được mô tả dưới đây.

4. Biểu hiện OsNRT2.3b ở cây lúa mỳ.

Sự biểu hiện ở mô libe của NRT2.3b, và các phát hiện gần đây, ví dụ như trong bài báo Fan et al. 2009 (thường giả định rằng nitrat được vận chuyển từ rễ đến chồi ở mô gỗ) về lượng đáng kể nitrat được vận chuyển trong mô libe, cùng với vai trò quan trọng của cân bằng pH nội mô ở mô libe cho thấy sự biểu hiện đặc hiệu ở mô libe của OsNRT2.3b rất quan trọng để thu được các tính trạng mong muốn (ví dụ hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện). Ví lý do này, cả vùng khởi đầu ubiquitin lẫn vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe được sử dụng để điều khiển biểu hiện OsNRT2.3b ở cây lúa mỳ. Vùng khởi đầu ubiquitin được sử dụng để chuyển gen như nêu trong Fig.27 và Fig.28. Cấu trúc của vectơ 35S-OsNRT2.3b được mô tả ở phần sản xuất giống lúa chuyển gen và giống lúa mỳ được sản xuất bằng phương pháp bắn hạt gen vào mô sẹo được nuôi cấy từ phôi chưa trưởng thành của giống lúa mỳ có khả năng chống chịu Yangmai158 như được mô tả trong bài báo Cao et al. Cây lúa mỳ chuyển gen có năng suất cao hơn so với cây lúa mỳ thể dại, tham khảo Fig.27 và Fig.28.

5. Khả năng chống chịu dịch bệnh của giống lúa chuyển gen.

Khả năng chống chịu dịch bệnh của giống lúa chuyển gen biểu hiện OsNRT2.3b được tạo ra như nêu trên được đánh giá ở trại thử nghiệm Hải Nam. Các dịch bệnh chủ yếu trên lúa ở trại thử nghiệm Hải Nam bao gồm bệnh héo vàng, bệnh đốm lá nhỏ và bệnh rỉ sọc. Đối với mỗi lô thử nghiệm, tỷ lệ sống sót được tính bằng tỷ lệ số cây lúa ở thời điểm thu hoạch/số cây lúa được cấy vào đầu tháng 1. Các cây lúa chuyển gen có tỷ lệ sống sót cao hơn so với các cây lúa thể dại thực vật (Fig.26).

Đoạn mồi để phân tích PCR định lượng gen OsNRT2.3b.

Đoạn mồi đặc hiệu cho gen.

OsNRT2.3b (AK072215)

Mồi xuôi:5'- CGTTCGCCGTGTT -3'(SEQ ID NO.21).

Mồi ngược:5'- TCGAAGCGGTCGTAG AAG -3' (SEQ ID NO.22).

Actin

Mồi xuôi:5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3'(SEQ ID NO.23).

Mồi ngược:5'-AGCACGGCTTGAATAGCG-3'(SEQ ID NO.24).

Đoạn mồi được sử dụng để biểu hiện quá mức các gen cấu trúc.

Vùng khởi đầu	**Vectơ**	**Đoạn mồi**	**Enzym**
CaMV-35S	pCAMBIA1302	Mồi xuôi: atCCATGGAGATCTCAGGGCACAGCGGATG (SEQ ID NO.25)	Bgl II
		Mồi ngược: atCCATGGAGATCT ACACCCCGGCCGG (SEQ ID NO.26)	Bgl II
Ubiquitin	pTCK303	Mồi xuôi: caACTAGTGCTACCACGTGTTGGAGATG (SEQ ID NO.27)	SpeI
		Mồi ngược: GaACTAGTGAGCAAACCACCAACAAGC (SEQ ID NO.28)	SpeI

Đoạn mồi được sử dụng để tách dòng cấp hai gen OsNRT2 và gen OsNAR2 vào pT7Ts.

Gen	**Vectơ tách dòng**	**Đoạn mồi dùng để tách dòng cấp hai**	**Vị trí tạo plasmit mạch thẳng**	**Vùng khởi đầu để tổng hợp ARN**
OsNRT2.3b (AK072215)	pLambda-FLC I	Mồi xuôi: AATCAGATCTTTGGAGCTCCACCGC (SEQ ID NO.29) Mồi ngược: CAGAACTAGTCCCCCCCTCGAAGG (SEQ ID NO.30)	Xba I	T7

Đoạn mồi đặc hiệu cho thể đột biến điểm H167R của OsNRT2.3b.

Đột biến	**Đoạn mồi đột biến gen**	**Biến đổi bộ ba mã hóa**	**Vị trí cắt giới hạn mới**
H167R-F	**GCCATT CGA AAGATCGGTAGCACGC** (SEQ ID NO.31) (trình tự ban đầu: GCCA**TC CAC** AAGATC GGTAGCACGC)[a] (SEQ ID NO.32)	**CAC (H) - CGA (R)**	Csp45 I **(TTCGAA)**
H167R-R	GCAT<u>TCTAGA</u>TTCGAATGGCCTCGTACACG (SEQ ID NO.33)		Xba I **(TCTAGA)**
H167RB-F	T7	XbaI **(TCTAGA)**	

67RB-R	GCATTCTAGA**TT CGA A**TGGCCTCGTACACG (SEQ ID NO.34)	Csp45I **(TTCGAA)**

[a] Sản phẩm mã hóa của ATT và ATC đều là axit amin isoleucin.

Đoạn mồi để phân tích PCR định lượng gen OsNRT2.3.

Gen	Đoạn mồi
OsNRT2.3a (AK072215)	Mồi xuôi: 5'- GCTCATCCGCGACACCCT -3' (SEQ ID NO.35)
	Mồi ngược:5'- GTCGAAGCGGTCG TAGAA -3' (SEQ ID NO.36)
OsNRT2.3b (AK072215)	Mồi xuôi:5'- CGTTCGCCGTGTT -3'(SEQ ID NO.37)
	Mồi ngược:5'- TCGAAGCGGTCGTAG AAG -3' (SEQ ID NO.38)
OsActin (NM_197297)	Mồi xuôi:5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3' (SEQ ID NO.39)
	Mồi ngược:5'-AGCACGGCTTGAATAGCG-3'(SEQ ID NO.40)

Bảng 1. Sự khác biệt về giai đoạn sinh trưởng giữa các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT*2.3b* và giống lúa thể dại trong các chậu thử nghiệm như được thể hiện trên Fig.16.

Giống	Ngày (ngày/tháng/năm)				
	Gieo mạ	Cấy	50% làm đòng	Trổ bông	Lúa chín
Giống lúa thể dại	10/05/2011	10/06/2011	16/08/2011	21/08/2011	08/10/2011
b-S2	10/05/2011	10/06/2011	01/09/2011	06/09/2011	28/10/2011
b-S6	10/05/2011	10/06/2011	02/09/2011	08/09/2011	28/10/2011

Lưu ý: Thử nghiệm trồng lúa trong chậu đất được thực hiện với 10 chậu lặp lại trong trại thử nghiệm thuộc Đại học Nông nghiệp Nanjing (dữ liệu được thể hiện Fig.SF9). Đất có tính axit (độ pH = 6,0, tỷ lệ đất: nước = 1:1) được thu gom từ trại thử nghiệm này. Một giống lúa thể dại, giống lúa b-S2 và giống lúa b-S6 thuộc hai giống riêng biệt được trồng trong mỗi chậu chứa 15kg đất đã được làm khô trong không khí có bổ sung 2,25g N (n = 10). Đất trong chậu được tưới ngập nước trong 1 ngày trước khi cấy và nước được duy trì ở chiều sâu nằm trong khoảng từ 5cm đến 10cm cho đến 15 ngày trước khi thu hoạch. Giai đoạn lúa chín được ghi nhận khi hầu hết các bông lúa trong chậu đã mất hoàn toàn màu xanh. Các mẫu giống lúa ở năm chậu lặp lại được thu hoạch khi giống lúa thể dại ở giai đoạn lúa chín, và các mẫu giống lúa ở năm chậu lặp lại còn lại được thu hoạch khi giống lúa b-S2 và b-S6 ở giai đoạn lúa chín. Các cây lúa được nhổ ra và chia thành phần hạt và phần sinh khối rơm rạ. Toàn bộ các mẫu giống lúa được làm khô trong lò ở nhiệt độ 70°C, cân và nghiền thành bột, sau đó lấy mẫu để định lượng nitơ. Nồng độ nitơ trong mô lúa và hạt lúa được định lượng bằng phương pháp macro-Kjeldahl.

Bảng 2. Đặc tính nông học của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và giống lúa thể dại trong các chậu thử nghiệm như được thể hiện trên Fig.16.

Giống	Chiều dài bông lúa (cm)	Khối lượng bông lúa (g)	Số lượng thân cấp một gié con	Số lượng thân cấp hai gié con	Số lượng hạt /Bông lúa	Khối lượng/1000 hạt (g)	Tỷ lệ lúa chín (%)
Thể dại	21,4 ± 0,4b	3,2 ± 0,2b	10,0 ± 0,5b	20,4 ± 1,6a	125,0 ± 7,9b	24,1 ± 0,4a	83,9 ± 3,3a
b-S2	26,2 ± 0,7a	4,5 ± 0,3a	14,2 ± 0,4a	29,8 ± 2,6a	225,3 ± 9,4a	24,6 ± 0,4a	87,0 ± 2,5a
b-S6	26,1 ± 0,4a	4,4 ± 0,1a	13,9 ± 0,4a	27,9 ± 3,0a	218,0 ± 11,8a	24,3 ± 0,4a	87,0 ± 2,6a

Lưu ý: Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 10), các chữ cái thể hiện mức độ khác biệt giữa cây lúa thể dại và cây lúa biểu hiện quá mức ở mức ý nghĩa thống kê 5% bằng phân tích một biến ANOVA.

Bảng 3. Ảnh hưởng của sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đến sự tích tụ và chuyển hóa sinh khối rơm rạ trong các chậu thử nghiệm như được thể hiện trên Fig.16.

Giống	f_D (g/cây)	e_D-(f_D- f_{GD}) (g/cây)	(e_D-(f_D-f_{GD}))/e_D(%)	(e_D-(f_D-f_{GD}))/f_{GD}(%)
Thể dại	47,7 ± 1,0b	2,1 ± 0,4b	5,9 ± 1,3b	14,3 ± 2,8b
b-S2	61,0 ± 0,7a	11,0 ± 0,9a	21,9 ± 1,7a	50,2 ± 3,9a
b-S6	61,7 ± 0,6a	11,9 ± 0,8a	23,4 ± 1,6a	52,8 ± 3,1a

Lưu ý: 1) Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n =10). Các chữ cái (a,b) thể hiện mức độ khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5% so với cây lúa thể dại; 2) Thử nghiệm trồng lúa trong chậu đất được thực hiện như được mô tả trong Bảng 1; tỷ lệ chuyển hóa chất khô được tính theo công thức e_D-(f_D- f_{GD}); hiệu suất chuyển hóa chất khô được tính theo công thức (e_D-(f_D-f_{GD}))/e_D; tỷ lệ phân bố chuyển hóa chất khô được tính theo công thức (e_D-(f_D-f_{GD}))/f_{GD}.

Bảng 4. Ảnh hưởng của sự biểu hiện quá mức OsNRT2.3b đến sự tích tụ và chuyển hóa nitơ trong các chậu thử nghiệm như được thể hiện trên Fig.18.

Giống	f_N (mg/cây)	e_N-(f_N- f_{GN}) (mg/cây)	e_N-(f_N- f_{GN}) /e_N(%)	e_N-(f_N- f_{GN}) /f_{GN}(%)
Thể dại	424,6 ± 6,4b	109,4 ± 2,7b	29,5 ± 0,9b	67,2 ± 2,9b
b-S2	557,7 ± 2,9a	199,0 ± 4,4a	37,7 ± 0,6a	87,0 ± 0,8a
b-S6	556,1 ± 9,3a	209,7 ± 3,2a	39,6 ± 0,4a	88,6 ± 1,2a

Lưu ý:1) Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n =10). Các chữ cái (a,b) thể hiện mức độ khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5% so với cây lúa thể dại; 2) Thử nghiệm trồng lúa trong chậu đất được thực hiện như được mô tả trong Bảng 1; 3). Tỷ lệ chuyển hóa nitơ được tính theo công thức e_N-(f_N- f_{GN}); hiệu suất chuyển hóa nitơ được tính theo công thức e_N-(f_N- f_{GN}) /e_N; tỷ lệ phân bố chuyển hóa nitơ được tính theo công thức e_N-(f_N- f_{GN}) /f_{GN}.

Bảng 5. Đặc tính nông học của các giống lúa biểu hiện quá mức OsNRT2.3b và giống lúa thể dại trong các thử nghiệm trên đồng ruộng như được thể hiện trên Fig.2a.

Khối lượng khô (g/cây)	**0kg N**	**75kg N**	**150kg N**	**300kg N**
Thể dại	21,2 ± 0,6b	21,9 ± 1,1b	30,2 ± 1,0b	28,2 ± 4,0b
b-U1	35,0 ± 2,2a	40,5 ± 2.3a	57,1 ± 2.3a	60,8 ± 5,4a
b-U2	37,5 ± 1,7a	40,5 ± 3,1a	59,4 ± 3,4a	64,3 ± 3,5a
b-S2	37,1 ± 1,9a	40,1 ± 3,6a	57,9 ± 4,1a	63,4 ± 5,7a
b-S6	38,4 ± 3,1a	40,6 ± 2,8a	60,6 ± 4,8a	65,5 ± 5,2a
Số lượng đẻ nhánh				
Thể dại	9,3 ± 0,9a	9,3 ± 0,8a	11,0 ± 1,5a	11,3 ± 1,1a
b-U1	8,1 ± 0,9a	8,5 ± 0,9a	10,2 ± 1,5a	9,3 ± 1,3a
b-U2	8,1 ± 1,1a	8,6 ± 1,0a	9,2 ± 1,8a	9,2 ± 1,2a
b-S2	8,2 ± 1,2a	8,4 ± 13a	9,3 ± 1,9a	9,5 ± 1,2a
b-S6	8,3 ± 1,1a	8,6 ± 1,1a	9,4 ± 1,7a	9,2 ± 1,1a
Số lượng hạt/bông lúa				
Thể dại	116 ± 4,4b	119 ± 7,1b	117 ± 6,4b	120 ± 6,4b
b-U1	140 ± 8,0a	159 ± 9,5a	142 ± 8,0a	154 ± 7,0a
b-U2	148 ± 9,1a	164 ± 10,1a	165 ± 9,1a	167 ± 11,1a
b-S2	148 ± 8,6a	160 ± 9,1a	165 ± 9,6a	163 ± 12,6a
b-S6	152 ± 8,9a	174 ± 11,4a	170 ± 8,9a	180 ± 13,9a
Khối lượng/1000 hạt				
Thể dại	23,2 ± 0,2a	24,4 ± 0,2a	24,6 ± 0,2a	25,0 ± 0,6a
b-U1	23,2 ± 0,2a	24,2 ± 0,4a	24,2 ± 0,3a	25,0 ± 0,3a
b-U2	23,0 ± 0,3a	24,3 ± 0,2a	24,1 ± 0,4a	25,2 ± 0,6a
b-S2	22,9 ± 0,3a	24,2 ± 0,3a	24,1 ± 0,5a	25,0 ± 0,8a
b-S6	23,0 ± 0,3a	24,3 ± 0,4a	24,1 ± 0,4a	25,0 ± 0,8a
Tỷ lệ chín (%)				
Thể dại	64,9 ± 2,4b	68,1 ± 2,2b	78,9 ± 2,8b	83,3 ± 2,2b
b-U1	72,0 ± 2,0a	78,0 ± 1,5a	88,0 ± 2,9a	95,1 ± 3,0a
b-U2	73,0 ± 1,9a	78,8 ± 2,9a	88,3 ± 2,4a	94,5 ± 2,9a
b-S2	72,0 ± 2,6a	78,8 ± 2.3a	89,0 ± 2,2a	93,5 ± 1,6a
b-S6	74,0 ± 2,8a	79,5 ± 2,4a	88,0 ± 2,6a	92,9 ± 3,1a
Khối lượng hạt (g/cây)				
Thể dại	16,2 ± 0,4b	18,6 ± 0,9b	24,7 ± 0,8b	28,2 ± 1,0b
b-U1	18,9 ± 1,4a	25,5 ± 1,5a	31,8 ± 1,3a	34,0 ± 2,0a
b-U2	20,1 ± 0,9a	27,1 ± 2,1a	32,5 ± 1,8a	36,7 ± 2,0a
b-S2	20,0 ± 1,0a	25,6 ± 2,0a	33,0 ± 2.3a	36,1 ± 2.3a
b-S6	21,5 ± 1,7a	28,8 ± 2,0a	33,9 ± 2,7a	38,2 ± 2,4a

Lưu ý: 10 cây lúa từ mỗi lô lặp lại của mỗi thử nghiệm được lấy mẫu để phân tích ba lần đặc tính nông học nêu trên. Các trị số = trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 30). Các chữ cái (a,b) thể hiện mức độ khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5% so với cây lúa thể dại.

Các trình tự theo sáng chế

Trình tự axit nucleic OsNRT2.3b (SEQ ID NO.1), mã truy cập số AK072215, khung đọc mã mở dài nhất.

tham khảo: http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/report/KOME_AK072215.html.

ATGGAGGCTAAGCCGGT
GGCGATGGAGGTGGAGGGGGTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTCAGGATGCCGGT
GGACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGC
CTCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCGCCGTGTT
CGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCGACCTGGTCGGGCCCAGGCTGGCCTCCGCGTC
TCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTACTGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTCGGG
GTACCTCCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCATCTCGCTGGCGTCGTTCGTGTCGGCGCAGTT
CTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAAAGTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGG
CTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTCCAGCTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCAT
CCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTCACGGCGTGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCT
GATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAA
CTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCG
CCACGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGG
CGTCGAGCTCACCATCGACAACGTCGTGCACCAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAA
CCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCC
CGGCGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCCAGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTG
GGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGCGTCCTCTGCGTGGTGCTCGGAATCGTCGA
CTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTCGCCGTGATGGTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGC
GTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTCGTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTC
CGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGCGCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTTCCA
CGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATCAAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTG
CACGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAG
GAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGCCGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAA
GGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTCGCGGAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTC
GTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACCGTCCCCGTCGACGCGTCGCCGGCCGGGGT
GTGA

Trình tự axit nucleic OsNRT2.3a (SEQ ID NO.2), mã truy cập số AK109776, khung đọc mã mở dài nhất.

ATGGAGGCTAAGCCGGTG
GCGATGGAGGTGGAGGGGGTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTCAGGATGCCGGTG
GACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGCC
TCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCGCCGCGCCG
CCGCTGCTGCCGCTCATCCGCGACACCCTCGGGCTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCC
GGGATCGCGTCCGTGTCGGGCGCCGTGTTCGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCGAC
CTGGTCGGGCCCAGGCTGGCCTCCGCGTCTCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTAC
TGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTCGGGGTACCTCCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCATC
TCGCTGGCGTCGTTCGTGTCGGCGCAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAAA
GTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGGCTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTCCAG
CTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCATCCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTCACGGCG
TGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCTGATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTG
GCGTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAACTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATG
CACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCACGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATC
CTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGGCGTCGAGCTCACCATCGACAACGTCGTGCAC
CAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGC
TTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCCCGGCGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCC
AGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGC
GTCCTCTGCGTGGTGCTCGGAATCGTCGACTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTCGCCGTGATG
GTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGCGTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTC
GTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTCCGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGC
GCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTTCCACGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATC
AAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTGCACGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCG
CAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAGGAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGC
CGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAAGGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTCGCG
GAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTCGTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACC
GTCCCCGTCGACGCGTCGCCGGCCGGGGTGTGA

Trình tự axit amin OsNRT2.3b (SEQ ID NO.3, khung đọc mã mở dài nhất).

MEAKPVAMEVEGVEAAGGKPRFRMPVDSDLKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV
STFAVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILLTTPAVYCSSIIQSPSGYLLVRFFTGISLAS
FVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLLMPLVYEAIHKIGSTPFTAWRIA

FFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKLHKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALT
YGYSFGVELTIDNVVHQYFYDRFDVNLQTAGLIAASFGMANIISRPGGGLLSDWLSSRYG
MRGRLWGLThể dạiVQTIGGVLCVVLGIVDFSFAASVAVMVLFSFFVQAACGLTFGIVPFVSRR
SLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTKYKTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGG
MLVGPRKGATAEEYYSREWSDHEREKGFNAASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVD
ASPAGV

Trình tự axit amin OsNRT2.3a (SEQ ID NO.4).

MEAKPVAMEVEGVEAAGGKPRFRMPVDSDLKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV
STFAAPPLLPLIRDTLGLTATDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILL
TTPAVYCSSIIQSPSGYLLVRFFTGISLASFVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNL
GGGAVQLLMPLVYEAIHKIGSTPFTAWRIAFFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKL
HKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALTYGYSFGVELTIDNVVHQYFYDRFDVNLQTA
GLIAASFGMANIISRPGGGLLSDWLSSRYGMRGRLWGLThể dạiVQTIGGVLCVVLGIVDFSFA
ASVAVMVLFSFFVQAACGLTFGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTKY
KTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGGMLVGPRKGATAEEYYSREWSDHEREKGFNA
ASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVDASPAGV

Trình tự vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe (SEQ ID NO.5).

61 CAAATGTGCA ATGCTGATTA GAGTTTGCAG ATGCTGTTTG GTTTAGTTTA
GATGTGGCATTTTGTTAGTG GTTTCTTTGA TGAAAAATTC TTGGCTATGA TAAAGTTTGC
TTTCTGAATATATGAATAGT GGCCATGGTT CAAGAAACTC CAGTTAGGTG GGATAATTTA
TGGTGATTCTGGGCGCAATT CGGGGAAATT TTTTTTGGCG AGAATCTTAT CATTGAGATA
AAGAGGGCAAGAATATCAAC AGACTTTTAA TCTTAATAAA AAGCACTCTT AGCGTAAGAG
CAAAGCATTGCAATCTCGTG TGACAAGAAC GTTTCTTTTT CTCCATCTTT TTCTTTTTTA
CCAAAAAATGAGTGTTGCCA ACTGCTGCAC CTTCTTAGGC CGGTTTGTTC TTGTTTGGAA
CGCACGGAATGCCCGATGCA AAAAAAAAAA AGAAATGCTG TTAACAAATC ACTGTCCTGA
CACGGCTAATTAGGTGGTAA TTTGGTGCAT CTGCAAAGAA GCAACAGATG CTTTCTTTCA
CTGAAAGCATATTTGCATGA TTTCTTGTTT CTGCTTGTCC TCTCTCTGAT GCTGACTGTA
TTCCACTCTGCGCTGTAATG CCATGTTAGT GATTAATATG TTCAAAAGAG CATAAAAGAA
TTGCCAATTGGATGTTAGAG ATTACTGTGT TGTTCAAAAG AGCATAAAAG AATTACCAAT
TTGATGGTAGATGTTACTAG CACCACCTTG GTGTTTCCCC ATGGTTTTCT GCAATTCTGC
CCATGATCTTTCTGCTTTTC TGAAAGACCT ATGTTTCAGA GGTCAAGCTT CTGGAAGGTT
ATTAGGAGGGATGAGTCGTC ATTTTGTCTG TGGGCCCCAC TAGTCAGTGT CAATAGTTGT
AAAGGGTAGAAATTTTCTTG CTGTTTTTCT TGGAAACAAT TTCATTGCGC CTGATCTGAT
GGTCGGTCTGGTAATCAAAT CACCAGATCC TGAAATCCAC CAAATCAAAC CGTGAGATTT
TTGCAGAGGCAAAACAAGAA AAGCATCTGC TTTATTTCTC TCTTGCTTTC TTTTCATCCC
CAACCAGTCCTTTTTTCTTC TGTTTATTTG TAGAAGTCTA CCACCTGCAG TCTATTATTC
TACAGAGAAAAAGATTGAAG CTTTTTTTCT CCAAAGCTGA CAATGGTGCC GGCATATGCT
AATAGGATACTCCCTTCGTC TAGGAAAAAA CCAACCCACT ACAATTTTGA ATATATATTT
ATTCAGATTTGTTATGCTTC CTACTCCTTC TCAGGTATGG TGAGATATTT CATAGTATAA
TGAATTTGGACATATATTTG TCCAAATTCA TCGCATTATG AAATGTCTCG TTCGATCTAT
GTTGTTATATTATAGACGGA GATAGTAGAT TCGGTTATTT TTGGACAGAG AAAGTACTCG
CCTGTGCTAGTGACATGATT AGTGACACCA TCAGATTAAA AAAACATATG TTTTGATTAA
AAAAATGGGGAATTTGGGGG GAGCAATAAT TTGGGGTTAT CCATTGCTGT TTCATCATGT
CAGCTGAAAGGCCCTACCAC TAAACCAATA TCTGTACTAT TCTACCACCT ATCAGAATTC
AGAGCACTGGGGTTTTGCAA CTATTTATTG GTCCTTCTGG ATCTCGGAGA AACCCTCCAT
TCGTTTGCTCTTAATTAAAA GGGCAATTCT GCAGATATCC ATCACACTGG CGGCCGCTCG
AGCATGCATCTAGAGGCCCA ATTCGCCCA

* Trình tự tự axit nucleic, mã phân loại số GRMZM2G455124 của Ngô (Zea mays, SEQ ID NO.6).

ATGGCGGAGGGGGAGTTCAAGCCCGCGGCGATGCAGGTGGAGGCTCCTGCCGAGGCGGCG
GCGGCGCCGTCCAAGCCGCGGTTCAGGATGCCCGTCGACTCCGACAACAAGGCCACCGAG
TTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCGCACATGAGCGCCTTCCACATGTCGTGGTTCTCC
TTCTTCTGCTGCTTCCTCTCCACCTTCGCGGCGCCGCCGCTGCTCCCGCTCATCCGGGAC
ACGCTGGGGCTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCCGGGATCGCCTCCGTGTCCGGCGCG
GTCTTCGCGCGCGTGGCCATGGGCACGGCGTGCGACCTGGTGGGCCCGCGCCTGGCGTCC
GCGGCCATCATACTCCTCACCACGCCCGCCGTCTACTACTCCGCCGTCATCGACTCCGCC
TCGTCCTACCTGCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCTTCTCGCTCGCGTCCTTCGTGTCCACG
CAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGCCGCCCAAGGTGGGGCTGGCCAACGGCGTCGCC
GGGGGGTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTGCAGCTCATCATGCCGCTCGTGTTCGAG
GCCATCCGCAAGGCCGGGGCCACGCCGTTCACGGCGTGGCGCGTCGCCTTCTTCGTCCCG

GGCCTGCTGCAGACGCTGTCGGCCGTCGCCGTGCTGGCGTTCGGCCAGGACATGCCCGAC
GGCAACTACCGCAAGCTGCACAGGTCCGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTG
CTCCGCCACGCCGTCACCAACTACCGCGCCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGATACTGC
TTCGGCGTGGAGCTCGCCGTGGACAACATCGTCGCGCAGTACTTCTACGACCGCTTCGGC
GTCAAGCTCAGCACCGCCGGCTTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCGTCTCC
CGCCCCGGCGGCGGCCTCCTGTCGGACTGGCTCTCCAGCCGCTTCGGCATGCGCGGCAGG
CTGTGGGGCCTGTGGGTGGTGCAGACCATCGGGGGCGTCCTCTGCGTCGTGCTCGGCGCC
GTCGACTACTCCTTCGCCGCGTCCGTGGCCGTCATGATACTCTTCTCCATGTTCGTGCAG
GCGGCCTGCGGGCTCACCTTTGGCATCGTCCCGTTCGTCTCCCGAAGGTCGCTGGGGCTC
ATCTCCGGCATGACCGGCGGCGGCGGCAACGTGGGCGCCGTGCTCACGCAGCTCATCTTC
TTCCACGGATCCAAGTACAAGACGGAGACGGGGATCAAGTACATGGGGTTCATGATCATC
GCCTGCACGTTGCCCATCACGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGTTCCTGGGG
CCGCGGCCCGGGGCGACGGCGGAGGACTACTACAACCGGGAGTGGACAGCGCACGAGTGC
GACAAGGGTTTCAACACCGCGAGCGTACGCTTTGCGGAGAACAGCGTGCGGGAAGGGGGA
CGCTCGGGCAGCCAGTCCAAGCACACTACTGTGCCCGTCGAGTCCTCGCCGGCCGACGTG
TGA

* Trình tự tự axit amin, mã phân loại số GRMZM2G455124 của Ngô (Zea mays, SEQ ID NO.7).

MAEGEFKPAAMQVEAPAEAAAAPSKPRFRMPVDSDNKATEFWLFSFARPHMSAFHMSWFSFFCCFLSTFAAPPLLPL
IRDTLGLTATDIGNAGIASVSGAVFARVAMGTACDLVGPRLASAAIILLTTPAVYYSAVIDSASSYLLVRFFTGFSL
ASFVSTQFWMSSMFSPPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLIMPLVFEAIRKAGATPFTAWRVAFFVPGLLQTLSAVAV
LAFGQDMPDGNYRKLHRSGDMHKDSFGNVLRHAVTNYRAWILALTYGYCFGVELAVDNIVAQYFYDRFGVKLSTAGF
IAASFGMANIVSRPGGGLLSDWLSSRFGMRGRLWGLWVVQTGGVLCVVLGAVDYSFAASVAVMILFSMFVQAACGLT
FGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQLIFFHGSKYKTETGIKYMGFMIIACTLPITLIYFPQWGGMFLGPRP
GATAEDYYNREThể dạiAHECDKGFNTASVRFAENSVREGGRSGSQSKHTTVPVESSPADV

Trình tự tự axit nucleic, mã phân loại số Glyma13g39850 của Đậu tương (Glyxin max, SEQ ID NO.8).

TCACACTTTCTTCCTTAATTTTCTAGCTCTTGCTACGTACTTGAATTCAATTAGTTATTA
ATGGCTGAGATTGAGGGTTCTCCCGGAAGCTCCATGCATGGAGTAACAGGAAGAGAACAA
ACATTTGTAGCCTCAGTTGCTTCTCCAATTGTCCCTACAGACACCACAGCCAAATTTGCT
CTCCCAGTGGATTCAGAACACAAGGCCAAGGTTTTCAAACTCTTCTCCCTGGCCAATCCC
CACATGAGAACCTTCCACCTTTCTTGGATCTCCTTCTTCACCTGCTTCGTCTCGACATTC
GCAGCAGCACCTCTTGTGCCCATCATCCGCGACAACCTTAACCTCACCAAAAGCGACATT
GGAAACGCCGGGGTTGCTTCTGTCTCCGGAAGCATCTTCTCAAGGCTCGCAATGGGTGCA
GTCTGTGACATGTTGGGTCCACGCTATGGCTGCGCCTTCCTCATCATGCTTTCGGCCCCT
ACGGTGTTCTGCATGTCCTTTGTGAAAGATGCTGCGGGGTACATAGCGGTTCGGTTCTTG
ATTGGGTTCTCGTTGGCGACGTTTGTGTCGTGCCAGTACTGGATGAGCACGATGTTCAAC
AGTAAGATTATAGGGCTTGCGAATGGGACTGCTGCGGGGTGGGGGAACATGGGTGGTGGA
GCCACTCAGCTCATAATGCCTTTGGTGTATGAGCTTATCAGAAGAGCTGGGGCTACTCCC
TTCACTGCTTGGAGGATTGCCTTCTTTGTTCCGGGTTTCATGCATGTCATCATGGGGATT
CTTGTCCTCACTCTAGGCCAGGACTTGCCTGATGGAAACCTCGGGGCCTTGCGGAAGAAG
GGTGATGTAGCTAAAGACAAGTTTTCCAAGGTGCTATGGTATGCCATAACAAATTACAGG
ACATGGATTTTTGCTCTCCTCTATGGGTACTCCATGGGAGTTGAATTAACAACTGACAAT
GTCATTGCTGAGTATTTCTATGACAGATTTAATCTCAAGCTACACACTGCTGGAATCATT
GCTGCTTCATTTGGAATGGCAAACTTAGTTGCTCGACCTTTTGGTGGATATGCTTCAGAT
GTTGCAGCCAGGCTGTTTGGCATGAGGGGAAGACTCTGGACCCTTTGGATCCTCCAAACC
TTAGGAGGGGTTTTCTGTATTTGGCTTGGCCGTGCCAATTCTCTTCCTATTGCTGTATTG
GCCATGATCCTGTTCTCTATAGGAGCTCAAGCTGCATGTGGTGCAACTTTTGGCATCATT
CCTTTCATCTCAAGAAGGTCTTTGGGGATCATATCAGGTCTAACTGGTGCAGGTGGAAAC
TTTGGGTCTGGCCTCACCCAATTGGTCTTCTTTTCAACCTCCAAATTCTCTACTGCCACA
GGTCTCTCCTTGATGGGTGTAATGATAGTGGCTTGCACTCTACCAGTGAGTGTTGTTCAC
TTCCCACAGTGGGGTAGCATGTTTCTACCACCCTCAAAAGATGTCAGCAAATCCACTGAA
GAATTCTATTACACCTCTGAATGGAATGAGGAAGAGAAGCAGAAGGGTTTGCACCAGCAA
AGTCTCAAATTTGCTGAGAATAGCCGATCTGAGAGAGGAAAGCGAGTGGCTTCAGCACCA
ACACCTCCAAATGCAACTCCCACTCATGTCTAGCCATAGCACTTCAATCAAAGAAGATCA
TGAAACATAATTACTGAGCAGTATTGGGAATGAAGAACCATGAGTTGAAGAATTTTCTAA
TAAGAAATCTTGTAACATGTAGACATAGAATGTTCTGGTTCTGGTTTGCGTGTGGTGTAA
GAGTTGTCTACTTGTGGTAAGTCATAAGTATCATAATCAGTATGTCAATGCAGATCTTGA
TGCTGAGTATCAATAGTATCAAAAAAAAAA

Trình tự tự axit amin, mã phân loại số Glyma13g39850 của Đậu tương (Glyxin max, SEQ ID NO.9).

MAEIEGSPGSSMHGVTGREQTFVASVASPIVPTDTTAKFALPVDSEHKAKVFKLFSLANPHMRTFHLSWISFFTCFV
STFAAAPLVPIIRDNLNLTKSDIGNAGVASVSGSIFSRLAMGAVCDMLGPRYGCAFLIMLSAPTVFCMSFVKDAAGY
IAVRFLIGFSLATFVSCQYWMSTMFNSKIIGLANGTAAGWGNMGGGATQLIMPLVYELIRRAGATPFTAWRIAFFVP
GFMHVIMGILVLTLGQDLPDGNLGALRKKGDVAKDKFSKVLWYAITNYRTWIFALLYGYSMGVELTTDNVIAEYFYD
RFNLKLHTAGIIAASFGMANLVARPFGGYASDVAARLFGMRGRLTh
dạiLWILQTLGGVFCIWLGRANSLPIAVLAMILFSIGAQAACGATFGIIPFISRRSLGIISGLTGAGGNFGSGLTQL
VFFSTSKFSTATGLSLMGVMIVACTLPVSVVHFPQWGSMFLPPSKDVSKSTEEFYYTSEWNEEEKQKGLHQQSLKFA
ENSRSERGKRVASAPTPPNATPTHV

Trình tự tự axit nucleic, mã phân loại số Glyma12g30050 của Đậu tương (Glyxin max, SEQ ID NO.10).

atggctgaga ttgagggttc tcctggaagc tccatgcatg gagtaacagg aagagaacaa acattcgtag
cctcaattgc ttctccaatt gtccccacag acaccacagc caaatttgct ctcccagtag actcagagca
caaggccaag attttcaaac tcttctccat ggccaatccc cacatgagaa ccttccacct ttcttggatc
tccttcttca cctgcttcgt ctcgaccttc gcagcagccc ctcttgtccc catcatccgc gacaacctta
acctcaccaa aagcgacatt ggaaacgccg gggttgcttc tgtctccgga agcatcttct ctaggcttgc
aatgggtgcg gtctgtgacc tattaggtcc acgttatggc tgtgccttcc tcatcatgct ctcggcccca
accgtgttct gcatgtcctt tgtgaaagat gctgcggggt acataatggt tcggttcttg
atagggttct ccttggcaac gttcgtgtca tgccagtact ggatgagcac gatgttcaac agtaagatta
tagggcttgc gaatggaact gctgcggggt gggggaacat gggtggtgga gccactcagc tcataatgcc
tttggtgtat gagcttatca gaagagctgg ggctactccc ttcactgctt ggaggatagc cttctttgta
ccgggtttca tgcatgtcat catggggatc
cttgtcctaa ctctaggcca ggacttgcct gatggaaacc ttgcggcctt gcagaagaag ggtgatgtag
caaaagacaa gttttccaag gtgctatggt atgccataac aaattacagg acatggattt ttgccctcct
ctatgggtac tcaatgggag ttgaattgac aactgacaat gtcattgctg agtatttcta tgacaggttt
aatctgaagc tgcacactgc tggaatcatt gctgcttcat ttggaatggc aaacttagtt gctcgaccct
ttggtggata tgcttctgat gttgcagcca gattgtttgg catgagggga agactctgga ccctttggat
cctccaaaca ttaggagggg ttttctgtat ttggcttggc cgagccaatt ctcttcctat tgctattttg
gctatgatcc tgttctcttt aggagctcaa gctgcatgtg gtgcaacttt tggcatcatt cccttcatct
caagaaggtc attggggatc atatcaggtc tcactggtgc aggtgggaac tttgggtctg gcctcaccca
attggtcttc ttttcaacat ccaaattctc cactgccaca ggtctctcct tgatgggtgt gatgatagtg
gcttgcactc ttcctgtgag tgttgttcat tttccacagt ggggtagcat gttcctacca ccatcaaaag
atgtcaacaa atccactgaa gaattctatt acacctctga atggaatgag gaagagaggc agaaaggctt
gcatcagcaa agtctcaagt ttgctgagaa tagccgatcc gagagaggaa agcgagtggc ttcagcacca
acacctccga atgcaactcc cactcatgtc

Trình tự tự axit amin, mã phân loại số Glyma12g30050 của Đậu tương (Glyxin max, SEQ ID NO.11).

MAEIEGSPGS SMHGVTGREQ TFVASIASPI VPTDTTAKFA LPVDSEHKAK IFKLFSMANP HMRTFHLSWI
SFFTCFVSTF AAAPLVPIIR DNLNLTKSDI GNAGVASVSG SIFSRLAMGA VCDLLGPRYG CAFLIMLSAP
TVFCMSFVKD AAGYIMVRFL IGFSLATFVS CQYWMSTMFN SKIIGLANGT AAGWGNMGGG ATQLIMPLVY
ELIRRAGATP FTAWRIAFFV PGFMHVIMGI
LVLTLGQDLP DGNLAALQKK GDVAKDKFSK VLWYAITNYR TWIFALLYGY SMGVELTTDN VIAEYFYDRF
NLKLHTAGII AASFGMANLV ARPFGGYASD VAARLFGMRG RLTh dạiLWILQT LGGVFCIWLG
RANSLPIAIL AMILFSLGAQ AACGATFGII PFISRRSLGI ISGLTGAGGN FGSGLTQLVF FSTSKFSTAT
GLSLMGVMIV ACTLPVSVVH FPQWGSMFLP PSKDVNKSTE
EFYYTSEWNE EERQKGLHQQ SLKFAENSRS ERGKRVASAP TPPNATPTHV

Trình tự tự axit nucleic, mã phân loại số MLOC_75087.1 của Lúa mạch (Hordeum vulgare, SEQ ID NO.12).

CCACGCGTCCGCTCATTGCATACGAGGTTGCCAACACTACACAGGTGTAGCAGCAGCCAA
GGCAGCTGGTGAGATGGAGGGGGAGTCCAAGCCGGCGGCGATGGGGGTGCAGGCGGCGCC
CAAGGGCAAGTTCAGGATACCGGTGGACTCGGACAACAAGGCCACCGAGTTCTGGCTTTT
CTCGTTCGTGAGGCCGCACATGAGCGCCTTCCACCTCTCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTG

CTTCGTCTCCACCTTCGCCGCGCCGCCCCTCCTGCCGCTCATCCGGGACAACCTCGGCCT
CACGGGCAAGGACATCGGCAACGCCGGCATCGCGTCCGTGTCCGGCGCCGTGTTCGCGCG
TCTCGCCATGGGCACGGCCTGCGACCTGGTCGGGCCCCGCCTGGCGTCCGCGGCCATCAT
ACTGCTCACCACCCCCGCGGTGTACTGCTCCGCCATCATCGAGTCCGCCTCGTCGTTCCT
GCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCTTCTCGCTCGCCTCCTTCGTGTCGACGCAGTTCTGGAT
GAGCTCCATGTTCTCTTCGCCCAAGGTGGGGCTGGCCAATGGCGTCGCCGGCGGCTGGGG
CAACCTGGGCGGGGGCGCCGTGCAGCTCCTCATGCCGCTCGTGTTCGAGGCCGTCCGCAA
GATCGGCAGCACGGATTTCATCGCGTGGCGCGTCGCCTTCTTCATCCCGGGCGTCATGCA
GACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGCAGGACATGCCGGACGGCAACTACCG
TAAGCTGCACAAGAGCGGGGAGATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCACGC
GGTCACGAACTACCGCGCCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACTCCTTCGGCGTGGA
GCTCGCCGTGGACAACATCGTCGCGCAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCA
CACGGCCGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCCGGGCGG
CGGGCTCATGTCCGACTGGCTCTCCGACCGGTTCGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGGCT
GTGGGTCGTGCAGACCATCGGCGGCATCCTCTGCATCGTGCTCGGCATCGTCGACTACTC
GTTCGGCGCGTCGGTGGCCGTCATGATCCTCTTCTCCTTCTTCGTGCAGGCGGCGTGCGG
GCTCACGTTCGGCATCGTGCCGTTCGTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTCCGGAAT
GACCGGCGGCGGCGGCAACGTGGGGGCCGTGCTGACGCAGGTCATCTTCTTCCGCGGCAC
CAAGTACAAGACGGAGACGGGGATCATGTACATGGGGCTGATGATCCTGGCATGCACGCT
GCCCATCACGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGTTCGTCGGGCCGCGGAAAGG
GGCGACGGCGGAGGAGTACTACAGCAAGGAGTGGACCGAGGAGGAGCGTGCCAAGGGGTA
CAGCGCCGCGACCGAGCGTTTCGCGGAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGCGGAGGGCGGC
GTCGGGCAGCCAGTCAAGGCACACCGTCCCCGTCGACGGCTCGCCGGCCGACGTGTGAGG
TCCGAAGAGCTCCCCGTACTACGTGGTCCACGGGTGCAATGGGGGAATACGATCGCGTCG
CACGGCCGCCCGGGTTTGGGCCGTCTTCCGTGCACATACGTAGTACTACGAACGCACGCA
CGCACGCCGGCTTTGTGCTGCTTCTAGTACTGTACGTACGTTTGGGTTTGGTGTGCTCGC
TTACCTTAATACTGCTCCGCATGTTGATGTTTATATGCTCCCTTGTGAAATACAGTTTTA
AAAAAAAAAAAAAAA

Trình tự tự axit amin, mã phân loại số MLOC_75087.1 của Lúa mạch (Hordeum vulgare, SEQ ID NO.13).

MEGESKPAAMGVQAAPKGKFRIPVDSDNKATEFWLFSFVRPHMSAFHLSWFSFFCCFVSTFAAPPLLPLIRDNLGLT
GKDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASAAIILLTTPAVYCSAIIESASSFLLVRFFTGFSLASFVSTQF
WMSSMFSSPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLLMPLVFEAVRKIGSTDFIAWRVAFFIPGVMQTFSAIAVLAFGQDMP
DGNYRKLHKSGEMHKDSFGNVLRHAVTNYRAWILALTYGYSFGVELAVDNIVAQYFYDRFDVNLHTAGLIAASFGMA
NIISRPGGGLMSDWLSDRFGMRGRLWGLWVVQTIGGILCIVLGIVDYSFGASVAVMILFSFFVQAACGLTFGIVPFV
SRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQVIFFRGTKYKTETGIMYMGLMILACTLPITLIYFPQWGGMFVGPRKGATAEEY
YSKEWTEEERAKGYSAATERFAENSVREGGRRAASGSQSRHTVPVDGSPADV

Trình tự tự axit nucleic, mã phân loại số Bradi2g47640 của Cỏ dứa dại (Brachypodium distachyon, SEQ ID NO.14).

ATGGGGGGGGAGTCGAAGCCGGCGGCGATGGATGTGGAGGCGCCGTCCAAGGCCAAGTTCA
GGATCCCCGTGGACTCCGACAACAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGCGGCCG
CACATGAGCGCGTTCCACCTGTCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACCTTCGCG
GCGCCGCCGCTGCTGCCGCTCATCCGGGACAATCTGGGGCTCACGGCCAAGGACATCGGCA
ACGCCGGGATCGCGTCGGTGTCGGGCGCCGTGTTCGCGCGTCTCGCCATGGGCACGGCCTGC
GACCTGGTCGGCCCCCGCCTGGCGTCCGCGGCCATCATACTGCTCACCACCCCGGCGGTGTA
CTGCTCGGCCATCATCGACTCGGCGTCGTCGTTCCTGCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCTTCTC
CCTGGCCTCCTTCGTGTCCACGCAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCCTCGCCCAAGGTGGG
TCTGGCCAACGGCGTGGCCGGGGGCTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTGCAGCTGATC
ATGCCGCTGGTGTTCGAGGTCGTGCGCAAGATCGGGAGCACGCGGTTCACGGCGTGGCGCG
TGGCCTTCTTCATCCCGGGCGTCATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGC
AGGACATGCCGGACGGCAACTACCACAAGCTGCACAAGACCGGGGAGATGCACAGGGACA
GCTTCCGCAACGTGCTGCGCCACGCGGTCACCAACTACCGCGCCTGGATCCTGGCGCTCACC
TACGGCTACTGCTTCGGCGTGGAGCTCGCCGTGGACAACATCGTGGCGCAGTACTTCTACGA
CCGCTTCGGCGTCAACCTCCACACGGCGGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACA

TCGTCTCGCGCCCGGGCGGCGGGCTCATGTCCGACTGGCTCTCGGCCCGGTTCGGCATGCGC
GGCAGGCTGTGGGGCCTGTGGGTCGTGCAGACCATCGGCGGCGTCCTCTGCGTGGTGCTCGG
CGTGGTGGACTACTCCTTCGGCGCGTCCGTGGCAGTCATGATACTCTTCTCCCTGTTCGTGCA
GGCCGCGTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTCGTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCA
TCTCTGGCATGACCGGCGGCGGGGGAAATGTGGGCGCCGTGCTGACGCAGGTCATCTTCTTC
CACGGGTCCAGGTACAAGACGGAGACGGGGATCATGTACATGGGGGTCATGATCATCGCGT
GCACGCTGCCCATCACGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGTTCACCGGGCCGCGG
CCGGGGGCCACGGCGGAGGAGTATTACAGCTCGGAGTGGACCGAGGAGGAGCGGAAGAAA
GGGTACAACGCCGCGACAGAGCGTTTCGCGGAGAACAGCCTGCGCGAGGGAGGGCGGAGG
GCCGCGTCGGGCAGCCAGTCCAAGCATACCGTCCCCGTGGACGGATCACCGCCGGCCGACG
TGTGAAGAAAATCCCATAGACCATAGTGTACGTTTCGTATGTCTCGCGTCTATAACGAGTCA
TACGGTCGCCACGGTCGCCGGTCTGGTTACGTGCGTTGGCTTTTTTATGTGTTGTACCTTTTG
GCTTTTGGTGCTCCTTTGTCTTGTTGCTGTAAAAGGTTGTCAAATACTCCACTTTTCTTTTCCG
CAGACGTGAAATACTTCTGTAGGTGTACGTCACTGAAAGGAAACTGTTCATATGGCATCCAC
ATACAAAACCATGTTTTCTTATATTGCTAGTATATTCGTTTTTCTTATTTCGACGAAACTAGC
ATTCCGCGTCTATTATTATTCGTAAGATACTTCCGATCGAAAA

Trình tự tự axit nucleic, mã phân loại số Bradi2g47640 của Cỏ dứa dại (Brachypodium distachyon, SEQ ID NO.15).

MGGESKPAAMDVEAPSKAKFRIPVDSDNKATEFWLFSFARPHMSAFHLSWFSFFCCFVSTFAAPPLLPLIRDNLGLT
AKDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASAAIILLTTPAVYCSAIIDSASSFLLVRFFTGFSLASFVSTQF
WMSSMFSSPKVGLANGVAGGWGNLGGGAVQLIMPLVFEVVRKIGSTRFTAWRVAFFIPGVMQTFSAIAVLAFGQDMP
DGNYHKLHKTGEMHRDSFRNVLRHAVTNYRAWILALTYGYCFGVELAVDNIVAQYFYDRFGVNLHTAGLIAASFGMA
NIVSRPGGGLMSDWLSARFGMRGRLWGLWVVQTIGGVLCVVLGVVDYSFGASVAVMILFSLFVQAACGLTFGIVPFV
SRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQVIFFHGSRYKTETGIMYMGVMIIACTLPITLIYFPQWGGMFTGPRPGATAEEY
YSSEThể dạiEEERKKGYNAATERFAENSLREGGRRAASGSQSKHTVPVDGSPPADV

Trình tự axit nucleic OsNRT2.3b (SEQ ID NO.67), mã truy cập số AK072215 trình tự bazơ nitơ được gạch chân thể hiện khung đọc mã mở dài nhất.

GAGCGCCGGCCTCCCACCGGTCGCGTAAGATCACGCCCGAAATCTTTATTCATTTTCTCT
CCACCGGTTGCCCTCTCGCCGCACCCAACCATCGCGCCACGCCGCGCCGCGCTGCCGGAG
CCGCGCTTTCCGCTATGCTATAAGAGCTGACGCGCAGGGCACAGCGGATGTACGTACACA
CAGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTAAGCCGGT
GGCGATGGAGGTGGAGGGGGTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTCAGGATGCCGGT
GGACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGC
CTCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCGCCGTGTT
CGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCGACCTGGTCGGGCCCAGGCTGGCCTCCGCGTC
TCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTACTGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTCGGG
GTACCTCCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCATCTCGCTGGCGTCGTTCGTGTCGGCGCAGTT
CTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAAAGTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGG
CTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTCCAGCTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCAT
CCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTCACGGCGTGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCT
GATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTGGCGTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAA
CTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATGCACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCG
CCACGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATCCTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGG
CGTCGAGCTCACCATCGACAACGTCGTGCACCAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAA
CCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGCTTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCC
CGGCGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCCAGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTG
GGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGCGTCCTCTGCGTGGTGCTCGGAATCGTCGA
CTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTCGCCGTGATGGTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGC
GTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTCGTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTC
CGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGCGCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTTCCA
CGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATCAAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTG
CACGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCGCAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAG
GAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGCCGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAA

GGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTCGCGGAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTC
GTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACCGTCCCCGTCGACGCGTCGCCGGCCGGGGT
GTGAAGAATGCCACGGACAATAAGGTCGCGGTTGTAGTACAACTGTACAAATTGATGGTA
CGTGTCGTTTGACCGCGCGCGCGCACAGTGTGGGTCGTGGCCTCGTGGGCTTAGTGGAGT
ACAGTGAGGGGTGTACGTGTGTCGTGGCGCGCGCGGTCACCTCGGTGGCCTTGGGATTGG
GGGGGCACTATACGCTAGTACTCCAGATATATACGGGTTTGATTTACTTCTGTGGATCGG
CGCTTGTTGGTGGTTTGCTCCCTGTGGTTTTTGTGATGGTAATCATACTCATACTCAAAC
AGTCAAAACTTTTTGATGCG

Trình tự axit nucleic OsNRT2.3a (SEQ ID NO.68), mã truy cập số AK109776 trình tự bazơ nitơ được gạch chân thể hiện khung đọc mã mở dài nhất.

AGTCACTAGCTAAGCTGCTAGCCTTGCTACCACGTGTTGGAGATGGAGGCTAAGCCGGTG
GCGATGGAGGTGGAGGGGGTCGAGGCGGCGGGGGGCAAGCCGCGGTTCAGGATGCCGGTG
GACTCCGACCTCAAGGCGACGGAGTTCTGGCTCTTCTCCTTCGCGAGGCCACACATGGCC
TCCTTCCACATGGCGTGGTTCTCCTTCTTCTGCTGCTTCGTGTCCACGTTCGCCGCGCCG
CCGCTGCTGCCGCTCATCCGCGACACCCTCGGGCTCACGGCCACGGACATCGGCAACGCC
GGGATCGCGTCCGTGTCGGGCGCCGTGTTCGCGCGTCTGGCCATGGGCACGGCGTGCGAC
CTGGTCGGGCCCAGGCTGGCCTCCGCGTCTCTGATCCTCCTCACCACACCGGCGGTGTAC
TGCTCCTCCATCATCCAGTCCCCGTCGGGGTACCTCCTCGTGCGCTTCTTCACGGGCATC
TCGCTGGCGTCGTTCGTGTCGGCGCAGTTCTGGATGAGCTCCATGTTCTCGGCCCCCAAA
GTGGGGCTGGCCAACGGCGTGGCCGGCGGCTGGGGCAACCTCGGCGGCGGCGCCGTCCAG
CTGCTCATGCCGCTCGTGTACGAGGCCATCCACAAGATCGGTAGCACGCCGTTCACGGCG
TGGCGCATCGCCTTCTTCATCCCGGGCCTGATGCAGACGTTCTCGGCCATCGCCGTGCTG
GCGTTCGGGCAGGACATGCCCGGCGGCAACTACGGGAAGCTCCACAAGACTGGCGACATG
CACAAGGACAGCTTCGGCAACGTGCTGCGCCACGCCCTCACCAACTACCGCGGCTGGATC
CTGGCGCTCACCTACGGCTACAGCTTCGGCGTCGAGCTCACCATCGACAACGTCGTGCAC
CAGTACTTCTACGACCGCTTCGACGTCAACCTCCAGACCGCCGGGCTCATCGCCGCCAGC
TTCGGGATGGCCAACATCATCTCCCGCCCCGGCGGCGGGCTACTCTCCGACTGGCTCTCC
AGCCGGTACGGCATGCGCGGCAGGCTGTGGGGGCTGTGGACTGTGCAGACCATCGGCGGC
GTCCTCTGCGTGGTGCTCGGAATCGTCGACTTCTCCTTCGCCGCGTCCGTCGCCGTGATG
GTGCTCTTCTCCTTCTTCGTCCAGGCCGCGTGCGGGCTCACCTTCGGCATCGTGCCGTTC
GTGTCGCGGAGGTCGCTGGGGCTCATCTCCGGGATGACCGGCGGCGGGGGCAACGTGGGC
GCCGTGCTGACGCAGTACATCTTCTTCCACGGCACAAAGTACAAGACGGAGACCGGGATC
AAGTACATGGGGCTCATGATCATCGCGTGCACGCTGCCCGTCATGCTCATCTACTTCCCG
CAGTGGGGCGGCATGCTCGTAGGCCCGAGGAAGGGGGCCACGGCGGAGGAGTACTACAGC
CGGGAGTGGTCGGATCACGAGCGCGAGAAGGGTTTCAACGCGGCCAGCGTGCGGTTCGCG
GAGAACAGCGTGCGCGAGGGCGGGAGGTCGTCGGCGAATGGCGGACAGCCCAGGCACACC
GTCCCCGTCGACGCGTCGCCGGCCGGGGTGTGAAGAATGCCACGGACAATAAGGTCGCGG
TTGTAGTACAACTGTACAAATTGATGGTACGTGTCGTTTGACCGCGCGCGCGCACAGTGT
GGGTCGTGGCCTCGTGGGCTTAGTGGAGTACAGTGAGGGGTGTACGTGTGTCGTGGCGCG
CGCGGTCACCTCGGTGGCCTTGGGATTGGGGGGGCACTATACGCTAGTACTCCAGATATA
TACGGGTTTGATTTACTTCTGTGGATCGGCGCTTGTTGGTGGTTTGCTCCCTGTGGTTTT
TGTGATGGTAATCATACTCATACTCAAACAGTC

Tài liệu tham khảo

1. Edgerton, M.D. Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel. *Plant Physiol.* 149, 7-13 (2009).

2. Ju, X.T. *et al.* Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 3041-3046 (2009).

3. Guo, J.H. *et al.* Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327, 1008-1010 (2010).

4. Xu, G.H., Fan, X.R., Miller, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Ann Rev Biol.* 63, 153-182 (2012).

5. Robertson, G.P. & Vitousek, P.M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. *Ann Rev Environ and Res.* 34, 97-125 (2009).

6. Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., Befort, B.L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Nat Acad Sci USA.* 108, 20260-20264 (2011).

7. Sutton, M.A., Erisman,W., Leip, A., van Grinsven, H., Winiwarter, W. Too much of a good thing. *Nature* 472, 159-61 (2011).

8. Li, Y.L., Fan, X.R., Shen, Q.R. The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen use efficiency in rice plants. *Plant Cell Environ.* 31, 73-85 (2008).

9. Kirk, G.J.D. & Kronzucker, H.J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: a modeling study. *Ann Bot.* 96, 639-646 (2005).

10. Zhu, Y.*et al.* Adaptation of plasma membrane H(+)-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant Cell Environ.* 32, 1428-1440 (2009).

11. Araki, R., Hasegawa, H. Expression of rice (Oryza sativa L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breeding Sci.* 56, 295-302 (2006).

12. Cai, C. *et al.* Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *J Integ Plant Biol.* 50, 443-451 (2008).

13. Feng, H.M. *et al.* Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *J Exp Bot.* 62, 2319-2332 (2011).

14. Yan, M. *et al.* Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant Cell Environ.* 34, 1360-1372 (2011).

15. Katayama, H. *et al.* Production and characterization of transgenic rice plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (OsNRT2.1). *Breeding Sci.* 59, 237-243

(2009).

16. Suzui, N., Nakamura, S., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T. A putative acyl-CoA-binding protein is a major phloem sap protein in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot.* 57, 2571-2576 (2006).

17. Rao, T.P., Yano, K., Iijima, M., Yamauchi, A., Tatsumi, J. Regulation of rhizosphere acidification by photosynthetic activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) seedlings. *Ann Bot.* 89, 213-220 (2002).

18. Miller, A.J., Smith, S.J., Theodoulou, F.L. The heterologous expression of H^+-coupled transporters in Xenopus oocytes. In *Membrane Transport Plants and Fungi: Molecular Mechanisms and Control* (Blatt, M.R., Leigh, R.A. Sanders, D. eds) The Company of Biologists Ltd., Cambridge, UK, pp. 167-178 (1994).

19. Bröer, S. *et al.* Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in Xenopus laevis oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J.* 333, 167-174 (1998).

20. Kurschat, C.E. *et al.* Alkaline-shifted pH_0 sensitivity of AE2c1-mediated anion exchange reveals novel regulatory determinants in the AE2 N-terminal cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 281, 1885-1896 (2006).

21. Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor, G. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annu Rev Plant Biol.* 60, 455-484 (2009).

22. Kebeish, R. *et al.* Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol.* 25, 593-599 (2007).

23. Kosegarten, H., Grolig, F., Wieneke, J., Wilson, G. Hoffmann B. Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice and maize as monitored by 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 (and -6) -carboxyfluoresce in -fluorescence ratio. *Plant Physiol.* 113, 451-461 (2007).

24. Raven, J. & Smith, F. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76, 415-431 (1976).

25. Curie, C. & Briat, J. F. Iron transport and signaling in plants. *Ann Rev Plant*

Biol. 54, 183-206 (2003).

26. Bellati, J. *et al.* Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. *Plant Mol Biol.* 74, 105-118 (2010).

27. Rachmilevitch, S., Cousins, A.B., Bloom, A.J. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proc Nat Acad Sci USA.* 101, 11506-11510 (2004).

28. Stitt, M. *et al.* Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot.* 53, 959-970 (2002).

30. Backhausen, J.E., Kitzmann, C., Scheibe, R. Competition between electron acceptors in photosynthesis - regulation of the malate valve during CO_2 fixation and nitrite reduction. *Photosynth Res.* 42, 75-86 (1994).

31. Yamaya, T. *et al.* Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J. Exp Bot.* 53, 917-925 (2002).

32. Good, A.G. *et al.* Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Can. J. Bot.* 85, 252-262 (2007).

33. Shrawat, A.K., Carroll, R.T., DePauw, M., Taylor, G.J., Good, A.G. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue- specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotech J.* 6, 722-732 (2008).

34. Ai, P. *et al.* Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation. *Plant J.* 57, 798-809 (2009).

35. Fan, X.R. *et al.* Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency. *J Exp Bot.* 58, 1729-1740 (2007).

36. Ye, J. *et al.* A monoclonal-antibody-based ELISA for the detection of human FADD (Fas-associated death domain). *Biotechnol Appl Biochem.* 50,143-146 (2008).

37. Shanks, J.H., Lappin, T.R., Hill, C.M. In situ hybridization for erythropoietin messenger RNA using digoxigenin-labeled oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci.* 718, 362-365 (1994).

38. Tong, Y.P., Zhou, J.J., Li, Z., Miller, A.J. A two-component high affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J.* 41, 442-450 (2005).

39. Orsel, M. *et al.* Characterization of a two component nitrate transport and signalling high affinity nitrate uptake system in Arabidopsis; physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.* 142, 1304-1317 (2006).

40. Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., Tsay, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138, 1184-94 (2009).

41. Li, C., Wong, W.H. Model based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 31-36 (2001).

42. Li, Y., Gao, Y., Xu, X., Shen, Q., Guo, S. Light-saturated photosynthetic rate in high-nitrogen rice (Oryza sativa L.) leaves is related to chloroplastic CO_2 concentration. *J Exp Bot.* 60, 2351-2360 (2009).

43. Clough S, Bent A (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis. Plant J. 16: 735-743.

44. Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ (2006) Characterization of a Two-Component High-Affinity Nitrate Uptake System in Arabidopsis. Physiology and Protein-Protein Interaction. PLANT PHYSIOLOGY 142: 1304-1317.

45. Cao A, et al.Serine/threonine kinase gene Stpk-V, a key member of powdery mildew resistance gene Pm21, confers powdery mildew resistance in wheat. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 10;108(19):7727-32.

46. Hirel et al The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental Botany, Vol. 58, No. 9, pp. 2369-2387, 2007.

48. Saha et al. 1994 Planta 226: 429-442. Fan S-C, Lin C-S, Hsu P-K, Lin S-H, Tsay Y-F (2009) The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. The Plant Cell 21: 2750-2761.

49. Jia H, Ren H, Gu M, Zhao J, Sun S, Zhang X, Chen J, Wu P, Xu G (2011) The phosphate transporter gene OsPht1;8 is involved in phosphate homeostasis in rice. Plant Physiol 156: 1164-1175.

50. Kronzucker et al. Nitrate-Ammonium Synergism in Rice. A Subcellular Flux Analysis1. Plant Physiology, March 1999, Vol. 119, pp. 1041-1045, 1999.

51. Almagro A, Lin SH, Tsay YF (2008) Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. Plant Cell 20: 3289-3299.

52. Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF (2004) Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. Plant Cell Physiol 45: 1139-1148.

53. Crawford NM, Glass ADM (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci 3: 389-395.

54. Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF (2009) The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-tosink remobilization of nitrate. Plant Cell 21: 2750-2761.

55. Fan X, Gordon-Weeks R, Shen Q, Miller AJ (2006) Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. J Exp Bot 57: 1333-1340.

56. Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. Biochim Biophys Acta 1465: 219-235.

57. Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E (2011) Nitrate transceptor(s) in plants. J Exp Bot 62: 2299-2308.

58. Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999) Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. Plant Cell 11: 1381-1392.

59. Kirk GJD (2003) Rice root properties for internal aeration and efficient nutrient acquisition in submerged soil. New Phytol 159: 185-194.

60. Kronzucker HJ, Glass ADM, Siddiqi MY, Kirk GJD (2000) Comparative kinetic analysis of ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice: implications for rice cultivation and yield potential. New Phytol 145: 471-476.

61. Li BZ, Xin WJ, Sun SB, Shen QR, Xu GH (2006) Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. Plant Soil 287: 145-159.

62. Li JY, Fu YL, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J, et al (2010) The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. Plant Cell 22: 1633-1646.

63. Lin CM, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY, Tsay YF (2000) Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. Plant Physiol 122: 379-388.

64. Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, et al (2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. Plant Cell 20: 2514-2528.

65. Liu KH, Tsay YF (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. EMBO J 22: 1005-1013.

66. Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport and signalling. J Exp Bot 58: 2297-2306.

67. Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ (2008) Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. J Exp Bot 59: 111-119.

68. Okamoto M, Kumar A, Li WB, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM (2006) High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. Plant Physiol 140:1036-1046.

69. Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis: structure and gene expression. Plant Physiol 129: 886-896.

70. Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. FEBS Lett 581: 2290-2300.

71. Wang YY, Tsay YF (2011) Arabidopsis nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. Plant Cell 23: 1945-1957.

72. Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annu Rev Plant Biol 63: 153-182.

73. Yong Z, Kotur Z, Glass ADM (2010) Characterization of an intact two component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. Plant J 63: 739-748.

74. Zhou JJ, Fernández E, Galván A, Miller AJ (2000) A high affinity nitrate transport system from Chlamydomonas requires two gene products. FEBS Lett 466: 225-227.

75. Zhuo DG, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of Arabidopsis thaliana. Plant J 17: 563-568.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng sống sót và/hoặc khả năng hấp thu nitơ của thực vật bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó khi trình tự axit nucleic này mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, thì thực vật này không phải là cây lúa, và trong đó biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3; hoặc

c) được chọn từ trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.15 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.15.

2. Phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen có khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước:

a) bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật hoặc tế bào thực vật, trong đó khi trình tự axit nucleic này mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, thì thực vật này không phải là cây lúa, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3; hoặc

c) được chọn từ trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.15 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.15.

3. Phương pháp điều hòa cân bằng pH nội mô hoặc làm giảm mức độ axit hóa trong thực vật bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3; hoặc

c) được chọn từ trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.15 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.15

4. Phương pháp biến đổi khả năng vận chuyển nitrat và cân bằng pH nội mô của thực vật, bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó axit nucleic này chứa đột biến ở cấu trúc cảm biến độ pH VYEAIHKI (SEQ ID NO.16).

5. Phương pháp cải thiện khả năng sinh trưởng, năng suất, hiệu suất sử dụng nitơ, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng chống chịu dịch bệnh, khả năng sống sót, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hấp thu nitơ của thực vật bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó

được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

6. Phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen có khả năng sinh trưởng, năng suất, khả năng vận chuyển nitơ, khả năng hấp thu nitơ, khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi về nitơ và/hoặc hiệu suất sử dụng nitơ được cải thiện bao gồm bước biến nạp và biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật hoặc tế bào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe này chứa axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó thực vật này là cây lương thực được chọn từ ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương.

10. Thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa, trong đó khi axit nucleic này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, thì thực vật này không phải là cây lúa, và biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của axit nucleic cấu trúc này:

a) có cấu trúc cảm biến độ pH bào tương có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.16;

b) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1; hoặc

c) được chọn từ trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.14 hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng

trình tự ít nhất bằng 90% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.14.

11. Thực vật chuyển gen biểu hiện axit nucleic cấu trúc chứa trình tự axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, biến thể chức năng hoặc thể tương đồng của nó được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa vào thực vật, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe, và thực vật này không biểu hiện quá mức axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

12. Thực vật theo điểm 10 hoặc 11, trong đó trình tự điều hòa này là vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe.

13. Thực vật theo điểm 12, trong vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe này chứa axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5.

14. Thực vật theo điểm 10 hoặc 11, trong đó thực vật này là cây lương thực được chọn từ ngô, lúa, lúa mỳ, cải dầu, lúa miến, đậu tương, khoai tây, cà chua, nho, lúa mạch, đậu Hà Lan, đậu đỏ, đậu răng ngựa, rau diếp, bông, mía đường, củ cải đường, bông cải xanh hoặc các loại rau cải khác hoặc cây dương.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PLANT BIOSCIENCE LIMITED
<110> NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY
<120> PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA THỰC VẬT, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT CHUYỂN GEN VÀ THỰC VẬT CHUYỂN GEN
<130> PC926735WOA
<160> 68
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 1461
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<220>
<223> OsNRT2.3b, Mã truy cập số AK072215
<400> 1
atggaggcta agccggtggc gatggaggtg gagggggtcg aggcggcggg gggcaagccg 60
cggttcagga tgccggtgga ctccgacctc aaggcgacgg agttctggct cttctccttc 120
gcgaggccac acatggcctc cttccacatg gcgtggttct ccttcttctg ctgcttcgtg 180
tccacgttcg ccgtgttcgc gcgtctggcc atgggcacgg cgtgcgacct ggtcgggccc 240
aggctggcct ccgcgtctct gatcctcctc accacaccgg cggtgtactg ctcctccatc 300
atccagtccc cgtcggggta cctcctcgtg cgcttcttca cgggcatctc gctggcgtcg 360
ttcgtgtcgg cgcagttctg gatgagctcc atgttctcgg cccccaaagt ggggctggcc 420
aacggcgtgg ccggcggctg gggcaacctc ggcggcggcg ccgtccagct gctcatgccg 480
ctcgtgtacg aggccatcca caagatcggt agcacgccgt tcacggcgtg gcgcatcgcc 540
ttcttcatcc cgggcctgat gcagacgttc tcggccatcg ccgtgctggc gttcgggcag 600
gacatgcccg gcggcaacta cgggaagctc cacaagactg gcgacatgca caaggacagc 660
ttcggcaacg tgctgcgcca cgccctcacc aactaccgcg gctggatcct ggcgctcacc 720
tacggctaca gcttcggcgt cgagctcacc atcgacaacg tcgtgcacca gtacttctac 780
gaccgcttcg acgtcaacct ccagaccgcc gggctcatcg ccgccagctt cgggatggcc 840
aacatcatct cccgccccgg cggcgggcta ctctccgact ggctctccag ccggtacggc 900
atgcgcggca ggctgtgggg gctgtggact gtgcagacca tcggcggcgt cctctgcgtg 960
gtgctcggaa tcgtcgactt ctccttcgcc gcgtccgtcg ccgtgatggt gctcttctcc 1020
ttcttcgtcc aggccgcgtg cgggctcacc ttcggcatcg tgccgttcgt gtcgcggagg 1080
tcgctggggc tcatctccgg gatgaccggc ggcgggggca acgtgggcgc cgtgctgacg 1140
cagtacatct tcttccacgg cacaaagtac aagacggaga ccgggatcaa gtacatgggg 1200
ctcatgatca tcgcgtgcac gctgcccgtc atgctcatct acttcccgca gtggggcggc 1260
atgctcgtag gcccgaggaa gggggccacg gcggaggagt actacagccg ggagtggtcg 1320
gatcacgagc gcgagaaggg tttcaacgcg gccagcgtgc ggttcgcgga gaacagcgtg 1380
cgcgagggcg ggaggtcgtc ggcgaatggc ggacagccca ggcacaccgt ccccgtcgac 1440
gcgtcgccgg ccggggtgtg a 1461
<210> 2
<211> 1551
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<220>
<223> OsNRT2.3a, Mã truy cập số AK109776
<400> 2
atggaggcta agccggtggc gatggaggtg gagggggtcg aggcggcggg gggcaagccg 60
cggttcagga tgccggtgga ctccgacctc aaggcgacgg agttctggct cttctccttc 120
gcgaggccac acatggcctc cttccacatg gcgtggttct ccttcttctg ctgcttcgtg 180
tccacgttcg ccgcgccgcc gctgctgccg ctcatccgcg acaccctcgg gctcacggcc 240
acggacatcg gcaacgccgg gatcgcgtcc gtgtcgggcg ccgtgttcgc gcgtctggcc 300
atgggcacgg cgtgcgacct ggtcgggccc aggctggcct ccgcgtctct gatcctcctc 360
accacaccgg cggtgtactg ctcctccatc atccagtccc cgtcggggta cctcctcgtg 420
cgcttcttca cgggcatctc gctggcgtcg ttcgtgtcgg cgcagttctg gatgagctcc 480
atgttctcgg cccccaaagt ggggctggcc aacggcgtgg ccggcggctg gggcaacctc 540
ggcggcggcg ccgtccagct gctcatgccg ctcgtgtacg aggccatcca caagatcggt 600
agcacgccgt tcacggcgtg gcgcatcgcc ttcttcatcc cgggcctgat gcagacgttc 660
tcggccatcg ccgtgctggc gttcgggcag gacatgcccg gcggcaacta cgggaagctc 720
cacaagactg gcgacatgca caaggacagc ttcggcaacg tgctgcgcca cgccctcacc 780
aactaccgcg gctggatcct ggcgctcacc tacggctaca gcttcggcgt cgagctcacc 840
atcgacaacg tcgtgcacca gtacttctac gaccgcttcg acgtcaacct ccagaccgcc 900
gggctcatcg ccgccagctt cgggatggcc aacatcatct cccgccccgg cggcgggcta 960
ctctccgact ggctctccag ccggtacggc atgcgcggca ggctgtgggg gctgtggact 1020
gtgcagacca tcggcggcgt cctctgcgtg gtgctcggaa tcgtcgactt ctccttcgcc 1080
gcgtccgtcg ccgtgatggt gctcttctcc ttcttcgtcc aggccgcgtg cgggctcacc 1140
ttcggcatcg tgccgttcgt gtcgcggagg tcgctggggc tcatctccgg gatgaccggc 1200
ggcgggggca acgtgggcgc cgtgctgacg cagtacatct tcttccacgg cacaaagtac 1260
aagacggaga ccgggatcaa gtacatgggg ctcatgatca tcgcgtgcac gctgcccgtc 1320
atgctcatct acttcccgca gtggggcggc atgctcgtag gcccgaggaa gggggccacg 1380
gcggaggagt actacagccg ggagtggtcg gatcacgagc gcgag

aaggg tttcaacgcg 1440
gccagcgtgc ggttcgcgga gaacagcgtg cgcgagggcg ggaggtcgtc ggcgaatggc 1500
ggacagccca ggcacaccgt ccccgtcgac gcgtcgccgg ccggggtgtg a 1551
<210> 3
<211> 486
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<220>
<223> Trình tự axit amin OsNRT2.3b
<400> 3
Met Glu Ala Lys Pro Val Ala Met Glu Val Glu Gly Val Glu Ala Ala
1 5 10 15
Gly Gly Lys Pro Arg Phe Arg Met Pro Val Asp Ser Asp Leu Lys Ala
20 25 30
Thr Glu Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg Pro His Met Ala Ser Phe
35 40 45
His Met Ala Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys Phe Val Ser Thr Phe Ala
50 55 60
Val Phe Ala Arg Leu Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp Leu Val Gly Pro
65 70 75 80
Arg Leu Ala Ser Ala Ser Leu Ile Leu Leu Thr Thr Pro Ala Val Tyr
85 90 95
Cys Ser Ser Ile Ile Gln Ser Pro Ser Gly Tyr Leu Leu Val Arg Phe
100 105 110
Phe Thr Gly Ile Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Ala Gln Phe Trp Met
115 120 125
Ser Ser Met Phe Ser Ala Pro Lys Val Gly Leu Ala Asn Gly Val Ala
130 135 140
Gly Gly Trp Gly Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln Leu Leu Met Pro
145 150 155 160
Leu Val Tyr Glu Ala Ile His Lys Ile Gly Ser Thr Pro Phe Thr Ala
165 170 175
Trp Arg Ile Ala Phe Phe Ile Pro Gly Leu Met Gln Thr Phe Ser Ala
180 185 190
Ile Ala Val Leu Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Gly Gly Asn Tyr Gly
195 200 205
Lys Leu His Lys Thr Gly Asp Met His Lys Asp Ser Phe Gly Asn Val
210 215 220
Leu Arg His Ala Leu Thr Asn Tyr Arg Gly Trp Ile Leu Ala Leu Thr
225 230 235 240
Tyr Gly Tyr Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Ile Asp Asn Val Val His
245 250 255
Gln Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Asp Val Asn Leu Gln Thr Ala Gly Leu
260 265 270
Ile Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Ile Ile Ser Arg Pro Gly Gly
275 280 285
Gly Leu Leu Ser Asp Trp Leu Ser Ser Arg Tyr Gly Met Arg Gly Arg
290 295 300
Leu Trp Gly Leu Trp Thr Val Gln Thr Ile Gly Gly Val Leu Cys Val
305 310 315 320
Val Leu Gly Ile Val Asp Phe Ser Phe Ala Ala Ser Val Ala Val Met
325 330 335
Val Leu Phe Ser Phe Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly
340 345 350
Ile Val Pro Phe Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365
Thr Gly Gly Gly Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Tyr Ile Phe
370 375 380
Phe His Gly Thr Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Lys Tyr Met Gly
385 390 395 400
Leu Met Ile Ile Ala Cys Thr Leu Pro Val Met Leu Ile Tyr Phe Pro
405 410 415
Gln Trp Gly Gly Met Leu Val Gly Pro Arg Lys Gly Ala Thr Ala Glu
420 425 430
Glu Tyr Tyr Ser Arg Glu Trp Ser Asp His Glu Arg Glu Lys Gly Phe
435 440 445
Asn Ala Ala Ser Val Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val Arg Glu Gly Gly
450 455 460
Arg Ser Ser Ala Asn Gly Gly Gln Pro Arg His Thr Val Pro Val Asp
465 470 475 480
Ala Ser Pro Ala Gly Val
485
<210> 4
<211> 516
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<220>

<223> Trình tự axit amin OsNRT2.3a
<400> 4
Met Glu Ala Lys Pro Val Ala Met Glu Val Glu Gly Val Glu Ala Ala
1 5 10 15
Gly Gly Lys Pro Arg Phe Arg Met Pro Val Asp Ser Asp Leu Lys Ala
20 25 30
Thr Glu Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg Pro His Met Ala Ser Phe
35 40 45

His Met Ala Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys Phe Val Ser Thr Phe Ala
50 55 60
Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp Thr Leu Gly Leu Thr Ala
65 70 75 80
Thr Asp Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser Val Ser Gly Ala Val Phe
85 90 95
Ala Arg Leu Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp Leu Val Gly Pro Arg Leu
100 105 110
Ala Ser Ala Ser Leu Ile Leu Leu Thr Thr Pro Ala Val Tyr Cys Ser
115 120 125
Ser Ile Ile Gln Ser Pro Ser Gly Tyr Leu Leu Val Arg Phe Phe Thr
130 135 140
Gly Ile Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Ala Gln Phe Trp Met Ser Ser
145 150 155 160
Met Phe Ser Ala Pro Lys Val Gly Leu Ala Asn Gly Val Ala Gly Gly
165 170 175
Trp Gly Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln Leu Leu Met Pro Leu Val
180 185 190
Tyr Glu Ala Ile His Lys Ile Gly Ser Thr Pro Phe Thr Ala Trp Arg
195 200 205
Ile Ala Phe Phe Ile Pro Gly Leu Met Gln Thr Phe Ser Ala Ile Ala
210 215 220
Val Leu Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Gly Gly Asn Tyr Gly Lys Leu
225 230 235 240
His Lys Thr Gly Asp Met His Lys Asp Ser Phe Gly Asn Val Leu Arg
245 250 255
His Ala Leu Thr Asn Tyr Arg Gly Trp Ile Leu Ala Leu Thr Tyr Gly
260 265 270
Tyr Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Ile Asp Asn Val Val His Gln Tyr
275 280 285
Phe Tyr Asp Arg Phe Asp Val Asn Leu Gln Thr Ala Gly Leu Ile Ala
290 295 300
Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Ile Ile Ser Arg Pro Gly Gly Gly Leu
305 310 315 320
Leu Ser Asp Trp Leu Ser Ser Arg Tyr Gly Met Arg Gly Arg Leu Trp
325 330 335
Gly Leu Trp Thr Val Gln Thr Ile Gly Gly Val Leu Cys Val Val Leu
340 345 350
Gly Ile Val Asp Phe Ser Phe Ala Ala Ser Val Ala Val Met Val Leu
355 360 365
Phe Ser Phe Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ile Val
370 375 380
Pro Phe Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met Thr Gly
385 390 395 400
Gly Gly Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Tyr Ile Phe Phe His
405 410 415
Gly Thr Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Lys Tyr Met Gly Leu Met
420 425 430
Ile Ile Ala Cys Thr Leu Pro Val Met Leu Ile Tyr Phe Pro Gln Trp
435 440 445
Gly Gly Met Leu Val Gly Pro Arg Lys Gly Ala Thr Ala Glu Glu Tyr
450 455 460
Tyr Ser Arg Glu Trp Ser Asp His Glu Arg Glu Lys Gly Phe Asn Ala
465 470 475 480
Ala Ser Val Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val Arg Glu Gly Gly Arg Ser
485 490 495
Ser Ala Asn Gly Gly Gln Pro Arg His Thr Val Pro Val Asp Ala Ser
500 505 510
Pro Ala Gly Val
515
<210> 5
<211> 1759
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<220>
<223> Trình tự vùng khởi đầu đặc hiệu mô libe từ nucleotit số 61 đến 1819
<400> 5

caaatgtgca atgctgatta gagtttgcag atgctgtttg gtttagttta gatgtggcat 60
tttgttagtg gtttctttga tgaaaaattc ttggctatga taaagtttgc tttctgaata 120
tatgaatagt ggccatggtt caagaaactc cagttaggtg ggataattta tggtgattct 180
gggcgcaatt cggggaaatt ttttttggcg agaatcttat cattgagata aagagggcaa 240
gaatatcaac agacttttaa tcttaataaa aagcactctt agcgtaagag caaagcattg 300
caatctcgtg tgacaagaac gtttcttttt ctccatcttt ttctttttta ccaaaaaatg 360
agtgttgcca actgctgcac cttcttaggc cggtttgttc ttgtttggaa cgcacggaat 420
gcccgatgca aaaaaaaaaa agaaatgctg ttaacaaatc actgtcctga cacggctaat 480
taggtggtaa tttggtgcat ctgcaaagaa gcaacagatg ctttctttca ctgaaagcat 540
atttgcatga tttcttgttt ctgcttgtcc tctctctgat gctgactgta ttccactctg 600
cgctgtaatg ccatgttagt gattaatatg ttcaaaagag cataaaagaa ttgccaattg 660
gatgttagag attactgtgt tgttcaaaag agcataaaag aattaccaat ttgatggtag 720
atgttactag caccaccttg gtgtttcccc atggttttct gcaattctgc ccatgatctt 780
tctgcttttc tgaaagacct atgtttcaga ggtcaagctt ctggaaggtt attaggaggg 840
atgagtcgtc attttgtctg tgggccccac tagtcagtgt caatagttgt aaagggtaga 900
aattttcttg ctgtttttct tggaaacaat ttcattgcgc ctgatctgat ggtcggtctg 960
gtaatcaaat caccagatcc tgaaatccac caaatcaaac cgtgagattt ttgcagaggc 1020
aaaacaagaa aagcatctgc tttatttctc tcttgctttc ttttcatccc caaccagtcc 1080
ttttttcttc tgtttatttg tagaagtcta ccacctgcag tctattattc tacagagaaa 1140
aagattgaag ctttttttct ccaaagctga caatggtgcc ggcatatgct aataggatac 1200
tcccttcgtc taggaaaaaa ccaacccact acaattttga atatatattt attcagattt 1260
gttatgcttc ctactccttc tcaggtatgg tgagatattt catagtataa tgaatttgga 1320
catatatttg tccaaattca tcgcattatg aaatgtctcg ttcgatctat gttgttatat 1380
tatagacgga gatagtagat tcggttattt ttggacagag aaagtactcg cctgtgctag 1440
tgacatgatt agtgacacca tcagattaaa aaaacatatg ttttgattaa aaaaatgggg 1500
aatttggggg gagcaataat ttggggttat ccattgctgt ttcatcatgt cagctgaaag 1560
gccctaccac taaaccaata tctgtactat tctaccacct atcagaattc agagcactgg 1620
ggttttgcaa ctatttattg gtccttctgg atctcggaga aaccctccat tcgtttgctc 1680
ttaattaaaa gggcaattct gcagatatcc atcacactgg cggccgctcg agcatgcatc 1740
tagaggccca attcgccca 1759

<210> 6
<211> 1563
<212> ADN
<213> Zea mays
<220>
<223> Trình tự axit nucleic của Ngô - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 6

atggcggagg gggagttcaa gcccgcggcg atgcaggtgg aggctcctgc cgaggcggcg 60
gcggcgccgt ccaagccgcg gttcaggatg cccgtcgact ccgacaacaa ggccaccgag 120
ttctggctct tctccttcgc gaggccgcac atgagcgcct tccacatgtc gtggttctcc 180
ttcttctgct gcttcctctc caccttcgcg gcgccgccgc tgctcccgct catccgggac 240
acgctggggc tcacggccac ggacatcggc aacgccggga tcgcctccgt gtccggcgcg 300
gtcttcgcgc gcgtggccat gggcacggcg tgcgacctgg tgggcccgcg cctggcgtcc 360
gcggccatca tactcctcac cacgcccgcc gtctactact ccgccgtcat cgactccgcc 420
tcgtcctacc tgctcgtgcg cttcttcacg ggcttctcgc tcgcgtcctt cgtgtccacg 480
cagttctgga tgagctccat gttctcgccg cccaaggtgg ggctggccaa cggcgtcgcc 540
ggggggtggg gcaacctcgg cggcggcgcc gtgcagctca tcatgccgct cgtgttcgag 600
gccatccgca aggccggggc cacgccgttc acggcgtggc gcgtcgcctt cttcgtcccg 660
ggcctgctgc agacgctgtc ggccgtcgcc gtgctggcgt tcggccagga catgcccgac 720
ggcaactacc gcaagctgca caggtccggc gacatgcaca aggacagctt cggcaacgtg 780
ctccgccacg ccgtcaccaa ctaccgcgcc tggatcctgg cgctcaccta cggatactgc 840
ttcggcgtgg agctcgccgt ggacaacatc gtcgcgcagt acttctacga ccgcttcggc 900
gtcaagctca gcaccgccgg cttcatcgcc gccagcttcg ggatggccaa catcgtctcc 960
cgccccggcg gcggcctcct gtcggactgg ctctccagcc gcttcggcat gcgcggcagg 1020
ctgtggggcc tgtgggtggt gcagaccatc gggggcgtcc tctgcgtcgt gctcggcgcc 1080
gtcgactact ccttcgccgc gtccgtggcc gtcatgatac tcttctccat gttcgtgcag 1140
gcggcctgcg ggctcacctt tggcatcgtc ccgttcgtct cccgaaggtc gctggggctc 1200
atctccggca tgaccggcgg cggcggcaac gtgggcgccg tgctcacgca gctcatcttc 1260
ttccacggat ccaagtacaa gacggagacg gggatcaagt acatggggtt catgatcatc 1320
gcctgcacgt tgcccatcac gctcatctac ttcccgcagt ggggcggcat gttcctgggg 1380
ccgcggcccg gggcgacggc ggaggactac tacaaccggg agtggacagc gcacgagtgc 1440
gacaagggtt tcaacaccgc gagcgtacgc tttgcggaga acagcgtgcg ggaaggggga 1500
cgctcgggca gccagtccaa gcacactact gtgcccgtcg agtcctcgcc ggccgacgtg 1560
tga 1563

<210> 7
<211> 520
<212> PRT
<213> Zea mays
<220>
<223> Trình tự axit amin của Ngô - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 7

Met Ala Glu Gly Glu Phe Lys Pro Ala Ala Met Gln Val Glu Ala Pro
1 5 10 15
Ala Glu Ala Ala Ala Ala Pro Ser Lys Pro Arg Phe Arg Met Pro Val
20 25 30
Asp Ser Asp Asn Lys Ala Thr Glu Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg

35 40 45
Pro His Met Ser Ala Phe His Met Ser Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys
50 55 60
Phe Leu Ser Thr Phe Ala Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp
65 70 75 80
Thr Leu Gly Leu Thr Ala Thr Asp Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser
85 90 95
Val Ser Gly Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp
100 105 110
Leu Val Gly Pro Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ile Ile Leu Leu Thr Thr
115 120 125
Pro Ala Val Tyr Tyr Ser Ala Val Ile Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Leu
130 135 140
Leu Val Arg Phe Phe Thr Gly Phe Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Thr
145 150 155 160
Gln Phe Trp Met Ser Ser Met Phe Ser Pro Pro Lys Val Gly Leu Ala
165 170 175
Asn Gly Val Ala Gly Gly Trp Gly Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln
180 185 190
Leu Ile Met Pro Leu Val Phe Glu Ala Ile Arg Lys Ala Gly Ala Thr
195 200 205
Pro Phe Thr Ala Trp Arg Val Ala Phe Phe Val Pro Gly Leu Leu Gln
210 215 220
Thr Leu Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Asp
225 230 235 240
Gly Asn Tyr Arg Lys Leu His Arg Ser Gly Asp Met His Lys Asp Ser
245 250 255
Phe Gly Asn Val Leu Arg His Ala Val Thr Asn Tyr Arg Ala Trp Ile
260 265 270
Leu Ala Leu Thr Tyr Gly Tyr Cys Phe Gly Val Glu Leu Ala Val Asp
275 280 285
Asn Ile Val Ala Gln Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Gly Val Lys Leu Ser
290 295 300
Thr Ala Gly Phe Ile Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Ile Val Ser
305 310 315 320
Arg Pro Gly Gly Gly Leu Leu Ser Asp Trp Leu Ser Ser Arg Phe Gly
325 330 335
Met Arg Gly Arg Leu Trp Gly Leu Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly
340 345 350
Val Leu Cys Val Val Leu Gly Ala Val Asp Tyr Ser Phe Ala Ala Ser
355 360 365
Val Ala Val Met Ile Leu Phe Ser Met Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly
370 375 380
Leu Thr Phe Gly Ile Val Pro Phe Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu
385 390 395 400
Ile Ser Gly Met Thr Gly Gly Gly Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr
405 410 415
Gln Leu Ile Phe Phe His Gly Ser Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile
420 425 430
Lys Tyr Met Gly Phe Met Ile Ile Ala Cys Thr Leu Pro Ile Thr Leu
435 440 445
Ile Tyr Phe Pro Gln Trp Gly Gly Met Phe Leu Gly Pro Arg Pro Gly
450 455 460
Ala Thr Ala Glu Asp Tyr Tyr Asn Arg Glu Trp Thr Ala His Glu Cys
465 470 475 480
Asp Lys Gly Phe Asn Thr Ala Ser Val Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val
485 490 495
Arg Glu Gly Gly Arg Ser Gly Ser Gln Ser Lys His Thr Thr Val Pro
500 505 510
Val Glu Ser Ser Pro Ala Asp Val
515 520

<210> 8
<211> 1890
<212> ADN
<213> Glycine max
<220>
<223> Trình tự axit nucleic của Đậu tương - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 8
tcacactttc ttccttaatt ttctagctct tgctacgtac ttgaattcaa ttagttatta 60
atggctgaga ttgagggttc tcccggaagc tccatgcatg gagtaacagg aagagaacaa 120
acatttgtag cctcagttgc ttctccaatt gtccctacag acaccacagc caaatttgct 180
ctcccagtgg attcagaaca caaggccaag gttttcaaac tcttctccct ggccaatccc 240
cacatgagaa ccttccacct ttcttggatc tccttcttca cctgcttcgt ctcgacattc 300
gcagcagcac ctcttgtgcc catcatccgc gacaacctta acctcaccaa aagcgacatt 360
ggaaacgccg gggttgcttc tgtctccgga agcatcttct caaggctcgc aatgggtgca 420
gtctgtgaca tgttgggtcc acgctatggc tgcgccttcc tcatcatgct ttcggcccct 480
acggtgttct gcatgtcctt tgtgaaagat gctgcggggt acatagcggt tcggttcttg 540

```
attgggttct cgttggcgac gtttgtgtcg tgccagtact ggatgagcac gatgttcaac    600
agtaagatta tagggcttgc gaatgggact gctgcggggt gggggaacat gggtggtgga    660
gccactcagc tcataatgcc tttggtgtat gagcttatca gaagagctgg ggctactccc    720
ttcactgctt ggaggattgc cttctttgtt ccgggtttca tgcatgtcat catggggatt    780
cttgtcctca ctctaggcca ggacttgcct gatggaaacc tcggggcctt gcggaagaag    840
ggtgatgtag ctaaagacaa gttttccaag gtgctatggt atgccataac aaattacagg    900
acatggattt ttgctctcct ctatgggtac tccatgggag ttgaattaac aactgacaat    960
gtcattgctg agtatttcta tgacagattt aatctcaagc tacacactgc tggaatcatt   1020
gctgcttcat ttggaatggc aaacttagtt gctcgacctt ttggtggata tgcttcagat   1080
gttgcagcca ggctgtttgg catgagggga agactctgga ccctttggat cctccaaacc   1140
ttaggagggg ttttctgtat ttggcttggc cgtgccaatt ctcttcctat tgctgtattg   1200
gccatgatcc tgttctctat aggagctcaa gctgcatgtg gtgcaacttt tggcatcatt   1260
cctttcatct caagaaggtc tttggggatc atatcaggtc taactggtgc aggtggaaac   1320
tttgggtctg gcctcaccca attggtcttc ttttcaacct ccaaattctc tactgccaca   1380
ggtctctcct tgatgggtgt aatgatagtg gcttgcactc taccagtgag tgttgttcac   1440
ttcccacagt ggggtagcat gtttctacca ccctcaaaag atgtcagcaa atccactgaa   1500
gaattctatt acacctctga atggaatgag gaagagaagc agaagggttt gcaccagcaa   1560
agtctcaaat ttgctgagaa tagccgatct gagagaggaa agcgagtggc ttcagcacca   1620
acacctccaa atgcaactcc cactcatgtc tagccatagc acttcaatca aagaagatca   1680
tgaaacataa ttactgagca gtattgggaa tgaagaacca tgagttgaag aattttctaa   1740
taagaaatct tgtaacatgt agacatagaa tgttctggtt ctggtttgcg tgtggtgtaa   1800
gagttgtcta cttgtggtaa gtcataagta tcataatcag tatgtcaatg cagatcttga   1860
tgctgagtat caatagtatc aaaaaaaaaa                                    1890
<210>  9
<211>  530
<212>  PRT
<213>  Glycine max
<220>
<223>  Trình tự axit amin của Đậu tương - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400>  9
Met Ala Glu Ile Glu Gly Ser Pro Gly Ser Ser Met His Gly Val Thr
1               5                   10                  15
Gly Arg Glu Gln Thr Phe Val Ala Ser Val Ala Ser Pro Ile Val Pro
            20                  25                  30
Thr Asp Thr Thr Ala Lys Phe Ala Leu Pro Val Asp Ser Glu His Lys
        35                  40                  45
Ala Lys Val Phe Lys Leu Phe Ser Leu Ala Asn Pro His Met Arg Thr
    50                  55                  60
Phe His Leu Ser Trp Ile Ser Phe Phe Thr Cys Phe Val Ser Thr Phe
65                  70                  75                  80
Ala Ala Ala Pro Leu Val Pro Ile Ile Arg Asp Asn Leu Asn Leu Thr
                85                  90                  95
Lys Ser Asp Ile Gly Asn Ala Gly Val Ala Ser Val Ser Gly Ser Ile
            100                 105                 110
Phe Ser Arg Leu Ala Met Gly Ala Val Cys Asp Met Leu Gly Pro Arg
        115                 120                 125
Tyr Gly Cys Ala Phe Leu Ile Met Leu Ser Ala Pro Thr Val Phe Cys
    130                 135                 140
Met Ser Phe Val Lys Asp Ala Ala Gly Tyr Ile Ala Val Arg Phe Leu
145                 150                 155                 160
Ile Gly Phe Ser Leu Ala Thr Phe Val Ser Cys Gln Tyr Trp Met Ser
                165                 170                 175
Thr Met Phe Asn Ser Lys Ile Ile Gly Leu Ala Asn Gly Thr Ala Ala
            180                 185                 190
Gly Trp Gly Asn Met Gly Gly Gly Ala Thr Gln Leu Ile Met Pro Leu
        195                 200                 205
Val Tyr Glu Leu Ile Arg Arg Ala Gly Ala Thr Pro Phe Thr Ala Trp
    210                 215                 220
Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe Met His Val Ile Met Gly Ile
225                 230                 235                 240
Leu Val Leu Thr Leu Gly Gln Asp Leu Pro Asp Gly Asn Leu Gly Ala
                245                 250                 255
Leu Arg Lys Lys Gly Asp Val Ala Lys Asp Lys Phe Ser Lys Val Leu
            260                 265                 270
Trp Tyr Ala Ile Thr Asn Tyr Arg Thr Trp Ile Phe Ala Leu Leu Tyr
        275                 280                 285
Gly Tyr Ser Met Gly Val Glu Leu Thr Thr Asp Asn Val Ile Ala Glu
    290                 295                 300
Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Asn Leu Lys Leu His Thr Ala Gly Ile Ile
305                 310                 315                 320
Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Leu Val Ala Arg Pro Phe Gly Gly
                325                 330                 335
Tyr Ala Ser Asp Val Ala Ala Arg Leu Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu
            340                 345                 350
Trp Thr Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe Cys Ile Trp
        355                 360                 365
Leu Gly Arg Ala Asn Ser Leu Pro Ile Ala Val Leu Ala Met Ile Leu
```

```
    370                 375                 380
Phe Ser Ile Gly Ala Gln Ala Ala Cys Gly Ala Thr Phe Gly Ile Ile
385                 390                 395                 400
Pro Phe Ile Ser Arg Arg Ser Leu Gly Ile Ile Ser Gly Leu Thr Gly
                405                 410                 415
Ala Gly Gly Asn Phe Gly Ser Gly Leu Thr Gln Leu Val Phe Phe Ser
            420                 425                 430
Thr Ser Lys Phe Ser Thr Ala Thr Gly Leu Ser Leu Met Gly Val Met
        435                 440                 445
Ile Val Ala Cys Thr Leu Pro Val Ser Val Val His Phe Pro Gln Trp
    450                 455                 460
Gly Ser Met Phe Leu Pro Pro Ser Lys Asp Val Ser Lys Ser Thr Glu
465                 470                 475                 480
Glu Phe Tyr Tyr Thr Ser Glu Trp Asn Glu Glu Glu Lys Gln Lys Gly
                485                 490                 495
Leu His Gln Gln Ser Leu Lys Phe Ala Glu Asn Ser Arg Ser Glu Arg
            500                 505                 510
Gly Lys Arg Val Ala Ser Ala Pro Thr Pro Pro Asn Ala Thr Pro Thr
        515                 520                 525
His Val
    530
```

<210> 10
<211> 1590
<212> ADN
<213> Glycine max
<220>
<223> Trình tự axit nucleic của Đậu tương - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 10

```
atggctgaga ttgagggttc tcctggaagc tccatgcatg gagtaacagg aagagaacaa      60
acattcgtag cctcaattgc ttctccaatt gtccccacag acaccacagc caaatttgct     120
ctcccagtag actcagagca caaggccaag attttcaaac tcttctccat ggccaatccc     180
cacatgagaa ccttccacct ttcttggatc tccttcttca cctgcttcgt ctcgaccttc     240
gcagcagccc ctcttgtccc catcatccgc gacaacctta acctcaccaa aagcgacatt     300
ggaaacgccg gggttgcttc tgtctccgga agcatcttct ctaggcttgc aatgggtgcg     360
gtctgtgacc tattaggtcc acgttatggc tgtgccttcc tcatcatgct ctcggcccca     420
accgtgttct gcatgtcctt tgtgaaagat gctgcggggt acataatggt tcggttcttg     480
atagggttct ccttggcaac gttcgtgtca tgccagtact ggatgagcac gatgttcaac     540
agtaagatta tagggcttgc gaatggaact gctgcggggt gggggaacat gggtggtgga     600
gccactcagc tcataatgcc tttggtgtat gagcttatca gaagagctgg ggctactccc     660
ttcactgctt ggaggatagc cttctttgta ccgggtttca tgcatgtcat catggggatc     720
cttgtcctaa ctctaggcca ggacttgcct gatggaaacc ttgcggcctt gcagaagaag     780
ggtgatgtag caaaagacaa gttttccaag gtgctatggt atgccataac aaattacagg     840
acatggattt ttgccctcct ctatgggtac tcaatgggag ttgaattgac aactgacaat     900
gtcattgctg agtatttcta tgacaggttt aatctgaagc tgcacactgc tggaatcatt     960
gctgcttcat ttggaatggc aaacttagtt gctcgaccct ttggtggata tgcttctgat    1020
gttgcagcca gattgtttgg catgagggga agactctgga ccctttggat cctccaaaca    1080
ttaggagggg ttttctgtat ttggcttggc cgagccaatt ctcttcctat tgctattttg    1140
gctatgatcc tgttctcttt aggagctcaa gctgcatgtg gtgcaacttt tggcatcatt    1200
cccttcatct caagaaggtc attggggatc atatcaggtc tcactggtgc aggtgggaac    1260
tttgggtctg gcctcaccca attggtcttc ttttcaacat ccaaattctc cactgccaca    1320
ggtctctcct tgatgggtgt gatgatagtg gcttgcactc ttcctgtgag tgttgttcat    1380
tttccacagt ggggtagcat gttcctacca ccatcaaaag atgtcaacaa atccactgaa    1440
gaattctatt acacctctga atggaatgag gaagagaggc agaaaggctt gcatcagcaa    1500
agtctcaagt ttgctgagaa tagccgatcc gagagaggaa agcgagtggc ttcagcacca    1560
acacctccga atgcaactcc cactcatgtc                                     1590
```

<210> 11
<211> 530
<212> PRT
<213> Glycine max
<220>
<223> Trình tự axit amin của Đậu tương - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 11

```
Met Ala Glu Ile Glu Gly Ser Pro Gly Ser Ser Met His Gly Val Thr
1               5                   10                  15
Gly Arg Glu Gln Thr Phe Val Ala Ser Ile Ala Ser Pro Ile Val Pro
            20                  25                  30
Thr Asp Thr Thr Ala Lys Phe Ala Leu Pro Val Asp Ser Glu His Lys
        35                  40                  45
Ala Lys Ile Phe Lys Leu Phe Ser Met Ala Asn Pro His Met Arg Thr
    50                  55                  60
Phe His Leu Ser Trp Ile Ser Phe Phe Thr Cys Phe Val Ser Thr Phe
65                  70                  75                  80
Ala Ala Ala Pro Leu Val Pro Ile Ile Arg Asp Asn Leu Asn Leu Thr
                85                  90                  95
Lys Ser Asp Ile Gly Asn Ala Gly Val Ala Ser Val Ser Gly Ser Ile
            100                 105                 110
```

Phe Ser Arg Leu Ala Met Gly Ala Val Cys Asp Leu Leu Gly Pro Arg
115 120 125
Tyr Gly Cys Ala Phe Leu Ile Met Leu Ser Ala Pro Thr Val Phe Cys
130 135 140
Met Ser Phe Val Lys Asp Ala Ala Gly Tyr Ile Met Val Arg Phe Leu
145 150 155 160
Ile Gly Phe Ser Leu Ala Thr Phe Val Ser Cys Gln Tyr Trp Met Ser
165 170 175
Thr Met Phe Asn Ser Lys Ile Ile Gly Leu Ala Asn Gly Thr Ala Ala
180 185 190
Gly Trp Gly Asn Met Gly Gly Gly Ala Thr Gln Leu Ile Met Pro Leu
195 200 205
Val Tyr Glu Leu Ile Arg Arg Ala Gly Ala Thr Pro Phe Thr Ala Trp
210 215 220
Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe Met His Val Ile Met Gly Ile
225 230 235 240
Leu Val Leu Thr Leu Gly Gln Asp Leu Pro Asp Gly Asn Leu Ala Ala
245 250 255
Leu Gln Lys Lys Gly Asp Val Ala Lys Asp Lys Phe Ser Lys Val Leu
260 265 270
Trp Tyr Ala Ile Thr Asn Tyr Arg Thr Trp Ile Phe Ala Leu Leu Tyr
275 280 285
Gly Tyr Ser Met Gly Val Glu Leu Thr Thr Asp Asn Val Ile Ala Glu
290 295 300
Tyr Phe Tyr Asp Arg Phe Asn Leu Lys Leu His Thr Ala Gly Ile Ile
305 310 315 320
Ala Ala Ser Phe Gly Met Ala Asn Leu Val Ala Arg Pro Phe Gly Gly
325 330 335
Tyr Ala Ser Asp Val Ala Ala Arg Leu Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu
340 345 350
Trp Thr Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe Cys Ile Trp
355 360 365
Leu Gly Arg Ala Asn Ser Leu Pro Ile Ala Ile Leu Ala Met Ile Leu
370 375 380
Phe Ser Leu Gly Ala Gln Ala Ala Cys Gly Ala Thr Phe Gly Ile Ile
385 390 395 400
Pro Phe Ile Ser Arg Arg Ser Leu Gly Ile Ile Ser Gly Leu Thr Gly
405 410 415
Ala Gly Gly Asn Phe Gly Ser Gly Leu Thr Gln Leu Val Phe Phe Ser
420 425 430
Thr Ser Lys Phe Ser Thr Ala Thr Gly Leu Ser Leu Met Gly Val Met
435 440 445
Ile Val Ala Cys Thr Leu Pro Val Ser Val Val His Phe Pro Gln Trp
450 455 460
Gly Ser Met Phe Leu Pro Pro Ser Lys Asp Val Asn Lys Ser Thr Glu
465 470 475 480

Glu Phe Tyr Tyr Thr Ser Glu Trp Asn Glu Glu Glu Arg Gln Lys Gly
485 490 495
Leu His Gln Gln Ser Leu Lys Phe Ala Glu Asn Ser Arg Ser Glu Arg
500 505 510
Gly Lys Arg Val Ala Ser Ala Pro Thr Pro Pro Asn Ala Thr Pro Thr
515 520 525
His Val
530

<210> 12
<211> 1875
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<220>
<223> Trình tự axit nucleic của Lúa mạch - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 12
ccacgcgtcc gctcattgca tacgaggttg ccaacactac acaggtgtag cagcagccaa 60
ggcagctggt gagatggagg gggagtccaa gccggcggcg atgggggtgc aggcggcgcc 120
caagggcaag ttcaggatac cggtggactc ggacaacaag gccaccgagt tctggctttt 180
ctcgttcgtg aggccgcaca tgagcgcctt ccacctctcg tggttctcct tcttctgctg 240
cttcgtctcc accttcgccg cgccgcccct cctgccgctc atccgggaca acctcggcct 300
cacgggcaag gacatcggca acgccggcat cgcgtccgtg tccggcgccg tgttcgcgcg 360
tctcgccatg ggcacggcct gcgacctggt cgggccccgc ctggcgtccg cggccatcat 420
actgctcacc acccccgcgg tgtactgctc cgccatcatc gagtccgcct cgtcgttcct 480
gctcgtgcgc ttcttcacgg gcttctcgct cgcctccttc gtgtcgacgc agttctggat 540
gagctccatg ttctcttcgc ccaaggtggg gctggccaat ggcgtcgccg gcggctgggg 600
caacctgggc gggggcgccg tgcagctcct catgccgctc gtgttcgagg ccgtccgcaa 660
gatcggcagc acggatttca tcgcgtggcg cgtcgccttc ttcatcccgg gcgtcatgca 720
gacgttctcg gccatcgccg tgctggcgtt cgggcaggac atgccggacg gcaactaccg 780
taagctgcac aagagcgggg agatgcacaa ggacagcttc ggcaacgtgc tgcgccacgc 840
ggtcacgaac taccgcgcct ggatcctggc gctcacctac ggctactcct tcggcgtgga 900

gctcgccgtg gacaacatcg tcgcgcagta cttctacgac cgcttcgacg tcaacctcca 960
cacggccggg ctcatcgccg ccagcttcgg gatggccaac atcatctccc gcccgggcgg 1020
cgggctcatg tccgactggc tctccgaccg gttcggcatg cgcggcaggc tgtgggggct 1080
gtgggtcgtg cagaccatcg gcggcatcct ctgcatcgtg ctcggcatcg tcgactactc 1140
gttcggcgcg tcggtggccg tcatgatcct cttctccttc ttcgtgcagg cggcgtgcgg 1200
gctcacgttc ggcatcgtgc cgttcgtgtc gcggaggtcg ctggggctca tctccggaat 1260
gaccggcggc ggcggcaacg tgggggccgt gctgacgcag gtcatcttct tccgcggcac 1320
caagtacaag acggagacgg ggatcatgta catggggctg atgatcctgg catgcacgct 1380
gcccatcacg ctcatctact tcccgcagtg gggcggcatg ttcgtcgggc cgcggaaagg 1440
ggcgacggcg gaggagtact acagcaagga gtggaccgag gaggagcgtg ccaaggggta 1500
cagcgccgcg accgagcgtt tcgcggagaa cagcgtgcgc gagggcgggc ggagggcggc 1560
gtcgggcagc cagtcaaggc acaccgtccc cgtcgacggc tcgccggccg acgtgtgagg 1620
tccgaagagc tccccgtact acgtggtcca cgggtgcaat gggggaatac gatcgcgtcg 1680
cacggccgcc cgggtttggg ccgtcttccg tgcacatacg tagtactacg aacgcacgca 1740
cgcacgccgg ctttgtgctg cttctagtac tgtacgtacg tttgggtttg gtgtgctcgc 1800
ttaccttaat actgctccgc atgttgatgt ttatatgctc ccttgtgaaa tacagtttta 1860
aaaaaaaaaa aaaaa 1875

<210> 13
<211> 514
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
<220>
<223> Trình tự axit amin của Lúa mạch - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400> 13

Met Glu Gly Glu Ser Lys Pro Ala Ala Met Gly Val Gln Ala Ala Pro
1 5 10 15
Lys Gly Lys Phe Arg Ile Pro Val Asp Ser Asp Asn Lys Ala Thr Glu
20 25 30
Phe Trp Leu Phe Ser Phe Val Arg Pro His Met Ser Ala Phe His Leu
35 40 45
Ser Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys Phe Val Ser Thr Phe Ala Ala Pro
50 55 60
Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp Asn Leu Gly Leu Thr Gly Lys Asp
65 70 75 80
Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser Val Ser Gly Ala Val Phe Ala Arg
85 90 95
Leu Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp Leu Val Gly Pro Arg Leu Ala Ser
100 105 110
Ala Ala Ile Ile Leu Leu Thr Thr Pro Ala Val Tyr Cys Ser Ala Ile
115 120 125
Ile Glu Ser Ala Ser Ser Phe Leu Leu Val Arg Phe Phe Thr Gly Phe
130 135 140
Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Thr Gln Phe Trp Met Ser Ser Met Phe
145 150 155 160
Ser Ser Pro Lys Val Gly Leu Ala Asn Gly Val Ala Gly Gly Trp Gly
165 170 175
Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln Leu Leu Met Pro Leu Val Phe Glu
180 185 190
Ala Val Arg Lys Ile Gly Ser Thr Asp Phe Ile Ala Trp Arg Val Ala
195 200 205
Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe Ser Ala Ile Ala Val Leu
210 215 220
Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Asp Gly Asn Tyr Arg Lys Leu His Lys
225 230 235 240
Ser Gly Glu Met His Lys Asp Ser Phe Gly Asn Val Leu Arg His Ala
245 250 255
Val Thr Asn Tyr Arg Ala Trp Ile Leu Ala Leu Thr Tyr Gly Tyr Ser
260 265 270
Phe Gly Val Glu Leu Ala Val Asp Asn Ile Val Ala Gln Tyr Phe Tyr
275 280 285
Asp Arg Phe Asp Val Asn Leu His Thr Ala Gly Leu Ile Ala Ala Ser
290 295 300
Phe Gly Met Ala Asn Ile Ile Ser Arg Pro Gly Gly Gly Leu Met Ser
305 310 315 320
Asp Trp Leu Ser Asp Arg Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu Trp Gly Leu
325 330 335
Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly Ile Leu Cys Ile Val Leu Gly Ile
340 345 350
Val Asp Tyr Ser Phe Gly Ala Ser Val Ala Val Met Ile Leu Phe Ser
355 360 365
Phe Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ile Val Pro Phe
370 375 380
Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met Thr Gly Gly Gly
385 390 395 400
Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Val Ile Phe Phe Arg Gly Thr
405 410 415
Lys Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Met Tyr Met Gly Leu Met Ile Leu

```
            420                 425                 430
Ala Cys Thr Leu Pro Ile Thr Leu Ile Tyr Phe Pro Gln Trp Gly Gly
        435                 440                 445
Met Phe Val Gly Pro Arg Lys Gly Ala Thr Ala Glu Glu Tyr Tyr Ser
    450                 455                 460
Lys Glu Trp Thr Glu Glu Glu Arg Ala Lys Gly Tyr Ser Ala Ala Thr
465                 470                 475                 480
Glu Arg Phe Ala Glu Asn Ser Val Arg Glu Gly Gly Arg Arg Ala Ala
                485                 490                 495
Ser Gly Ser Gln Ser Arg His Thr Val Pro Val Asp Gly Ser Pro Ala
            500                 505                 510
Asp Val
<210>  14
<211>  1900
<212>  ADN
<213>  Brachypodium distachyon
<220>
<223>  Trình tự axit nucleic của Cỏ dứa dại - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400>  14
atgggggggg agtcgaagcc ggcggcgatg gatgtggagg cgccgtccaa ggccaagttc      60
aggatccccg tggactccga caacaaggcg acggagttct ggctcttctc cttcgcgcgg     120
ccgcacatga gcgcgttcca cctgtcgtgg ttctccttct tctgctgctt cgtgtccacc     180
ttcgcggcgc cgccgctgct gccgctcatc cgggacaatc tggggctcac ggccaaggac     240
atcggcaacg ccgggatcgc gtcggtgtcg ggcgccgtgt tcgcgcgtct cgccatgggc     300
acggcctgcg acctggtcgg cccccgcctg gcgtccgcgg ccatcatact gctcaccacc     360
ccggcggtgt actgctcggc catcatcgac tcggcgtcgt cgttcctgct cgtgcgcttc     420
ttcacgggct tctccctggc ctccttcgtg tccacgcagt tctggatgag ctccatgttc     480
tcctcgccca aggtgggtct ggccaacggc gtggccgggg gctggggcaa cctcggcggc     540
ggcgccgtgc agctgatcat gccgctggtg ttcgaggtcg tgcgcaagat cgggagcacg     600
cggttcacgg cgtggcgcgt ggccttcttc atcccgggcg tcatgcagac gttctcggcc     660
atcgccgtgc tggcgttcgg gcaggacatg ccggacggca actaccacaa gctgcacaag     720
accggggaga tgcacaggga cagcttccgc aacgtgctgc gccacgcggt caccaactac     780
cgcgcctgga tcctggcgct cacctacggc tactgcttcg gcgtggagct cgccgtggac     840
aacatcgtgg cgcagtactt ctacgaccgc ttcggcgtca acctccacac ggcggggctc     900
atcgccgcca gcttcgggat ggccaacatc gtctcgcgcc cgggcggcgg gctcatgtcc     960
gactggctct cggcccggtt cggcatgcgc ggcaggctgt ggggcctgtg ggtcgtgcag    1020
accatcggcg gcgtcctctg cgtggtgctc ggcgtggtgg actactcctt cggcgcgtcc    1080
gtggcagtca tgatactctt ctccctgttc gtgcaggccg cgtgcgggct caccttcggc    1140
atcgtgccgt tcgtgtcgcg gaggtcgctg gggctcatct ctggcatgac cggcggcggg    1200
ggaaatgtgg gcgccgtgct gacgcaggtc atcttcttcc acgggtccag gtacaagacg    1260
gagacgggga tcatgtacat gggggtcatg atcatcgcgt gcacgctgcc catcacgctc    1320
atctacttcc cgcagtgggg cggcatgttc accgggccgc ggccgggggc cacggcggag    1380
gagtattaca gctcggagtg gaccgaggag gagcggaaga aagggtacaa cgccgcgaca    1440
gagcgtttcg cggagaacag cctgcgcgag ggagggcgga gggccgcgtc gggcagccag    1500
tccaagcata ccgtccccgt ggacggatca ccgccggccg acgtgtgaag aaaatcccat    1560
agaccatagt gtacgtttcg tatgtctcgc gtctataacg agtcatacgg tcgccacggt    1620
cgccggtctg gttacgtgcg ttggcttttt tatgtgttgt accttttggc ttttggtgct    1680
cctttgtctt gttgctgtaa aaggttgtca aatactccac ttttcttttc cgcagacgtg    1740
aaatacttct gtaggtgtac gtcactgaaa ggaaactgtt catatggcat ccacatacaa    1800
aaccatgttt tcttatattg ctagtatatt cgtttttctt atttcgacga aactagcatt    1860
ccgcgtctat tattattcgt aagatacttc cgatcgaaaa                          1900
<210>  15
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Brachypodium distachyon
<220>
<223>  Trình tự axit amin của Cỏ dứa dại - gen liên quan đến OsNRT2.3b
<400>  15
Met Gly Gly Glu Ser Lys Pro Ala Ala Met Asp Val Glu Ala Pro Ser
1               5                   10                  15
Lys Ala Lys Phe Arg Ile Pro Val Asp Ser Asp Asn Lys Ala Thr Glu
            20                  25                  30
Phe Trp Leu Phe Ser Phe Ala Arg Pro His Met Ser Ala Phe His Leu
        35                  40                  45
Ser Trp Phe Ser Phe Phe Cys Cys Phe Val Ser Thr Phe Ala Ala Pro
    50                  55                  60
Pro Leu Leu Pro Leu Ile Arg Asp Asn Leu Gly Leu Thr Ala Lys Asp
65                  70                  75                  80
Ile Gly Asn Ala Gly Ile Ala Ser Val Ser Gly Ala Val Phe Ala Arg
                85                  90                  95
Leu Ala Met Gly Thr Ala Cys Asp Leu Val Gly Pro Arg Leu Ala Ser
            100                 105                 110
Ala Ala Ile Ile Leu Leu Thr Thr Pro Ala Val Tyr Cys Ser Ala Ile
        115                 120                 125
Ile Asp Ser Ala Ser Ser Phe Leu Leu Val Arg Phe Phe Thr Gly Phe
    130                 135                 140
Ser Leu Ala Ser Phe Val Ser Thr Gln Phe Trp Met Ser Ser Met Phe
```

145 150 155 160
Ser Ser Pro Lys Val Gly Leu Ala Asn Gly Val Ala Gly Gly Trp Gly
165 170 175
Asn Leu Gly Gly Gly Ala Val Gln Leu Ile Met Pro Leu Val Phe Glu
180 185 190
Val Val Arg Lys Ile Gly Ser Thr Arg Phe Thr Ala Trp Arg Val Ala
195 200 205
Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe Ser Ala Ile Ala Val Leu
210 215 220
Ala Phe Gly Gln Asp Met Pro Asp Gly Asn Tyr His Lys Leu His Lys
225 230 235 240
Thr Gly Glu Met His Arg Asp Ser Phe Arg Asn Val Leu Arg His Ala
245 250 255
Val Thr Asn Tyr Arg Ala Trp Ile Leu Ala Leu Thr Tyr Gly Tyr Cys
260 265 270
Phe Gly Val Glu Leu Ala Val Asp Asn Ile Val Ala Gln Tyr Phe Tyr
275 280 285
Asp Arg Phe Gly Val Asn Leu His Thr Ala Gly Leu Ile Ala Ala Ser
290 295 300
Phe Gly Met Ala Asn Ile Val Ser Arg Pro Gly Gly Gly Leu Met Ser
305 310 315 320
Asp Trp Leu Ser Ala Arg Phe Gly Met Arg Gly Arg Leu Trp Gly Leu
325 330 335
Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly Val Leu Cys Val Val Leu Gly Val
340 345 350
Val Asp Tyr Ser Phe Gly Ala Ser Val Ala Val Met Ile Leu Phe Ser
355 360 365
Leu Phe Val Gln Ala Ala Cys Gly Leu Thr Phe Gly Ile Val Pro Phe
370 375 380
Val Ser Arg Arg Ser Leu Gly Leu Ile Ser Gly Met Thr Gly Gly Gly
385 390 395 400
Gly Asn Val Gly Ala Val Leu Thr Gln Val Ile Phe Phe His Gly Ser
405 410 415
Arg Tyr Lys Thr Glu Thr Gly Ile Met Tyr Met Gly Val Met Ile Ile
420 425 430
Ala Cys Thr Leu Pro Ile Thr Leu Ile Tyr Phe Pro Gln Trp Gly Gly
435 440 445
Met Phe Thr Gly Pro Arg Pro Gly Ala Thr Ala Glu Glu Tyr Tyr Ser
450 455 460
Ser Glu Trp Thr Glu Glu Glu Arg Lys Lys Gly Tyr Asn Ala Ala Thr
465 470 475 480
Glu Arg Phe Ala Glu Asn Ser Leu Arg Glu Gly Gly Arg Arg Ala Ala
485 490 495
Ser Gly Ser Gln Ser Lys His Thr Val Pro Val Asp Gly Ser Pro Pro
500 505 510
Ala Asp Val
515

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<220>
<223> Cấu trúc cảm biến độ pH
<400> 16
Val Tyr Glu Ala Ile His Lys Ile
1 5

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi
<400> 17
ggaattctca caccccggcc gg 22

<210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược
<400> 18
cgggatccat gtggggcggc atgctc 26

<210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Mẫu dò lai hóa tại chỗ ARN - trình tự dùng làm khuôn
<400> 19
cgatggttgg gtgcggcgag a 21
<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mẫu dò lai hóa tại chỗ ARN - trình tự không dùng làm khuôn
<400> 20
gctaccaacc cacgccgctc t 21
<210> 21
<211> 13
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi dùng để phân tích PCR định lượng - OsNRT2.3b (AK072215)
<400> 21
cgttcgccgt gtt 13
<210> 22
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược dùng để phân tích PCR định lượng - OsNRT2.3b (AK072215)
<400> 22
tcgaagcggt cgtagaag 18
<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi dùng để phân tích PCR định lượng - Actin
<400> 23
ttatggttgg gatgggaca 19

<210> 24
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược dùng để phân tích PCR định lượng - Actin
<400> 24
agcacggctt gaatagcg 18
<210> 25
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi đặc hiệu cho các cấu trúc biểu hiện quá mức (Vectơ:pCAMBIA1302)
<400> 25
atccatggag atctcagggc acagcggatg 30
<210> 26
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược đặc hiệu cho các cấu trúc biểu hiện quá mức (Vectơ: pCAMBIA1302)
<400> 26
atccatggag atctacaccc cggccgg 27
<210> 27
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện quá mức (Vectơ: pTCK303)
<400> 27
caactagtgc taccacgtgt tggagatg 28
<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện quá mức (Vectơ: pTCK303)
<400> 28
gaactagtga gcaaaccacc aacaagc 27

<210> 29
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn môi xuôi dùng để tách dòng cấp hai
<400> 29
aatcagatct ttggagctcc accgc 25
<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn môi ngược dùng để tách dòng cấp hai
<400> 30
cagaactagt cccccccctcg aagg 24
<210> 31
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi đặc hiệu cho thể đột biến H167R-F
<400> 31
gccattcgaa agatcggtag cacgc 25
<210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự ban đầu
<400> 32
gccatccaca agatcggtag cacgc 25
<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi đặc hiệu cho thể đột biến H167R-R
<400> 33
gcattctaga ttcgaatggc ctcgtacacg 30
<210> 34
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi đặc hiệu cho thể đột biến 67RB-R
<400> 34
gcattctaga ttcgaatggc ctcgtacacg 30
<210> 35
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi dùng để phân tích PCR định lượng đặc hiệu cho OsNRT2.3a (AK072215)
<400> 35
gctcatccgc gacaccct 18
<210> 36
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược dùng để phân tích PCR định lượng đặc hiệu cho OsNRT2.3a (AK072215)
<400> 36
gtcgaagcgg tcgtagaa 18
<210> 37
<211> 13
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi dùng để phân tích PCR định lượng đặc hiệu cho OsNRT2.3b (AK072215)
<400> 37
cgttcgccgt gtt 13
<210> 38
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn mồi xuôi dùng để phân tích PCR định lượng đặc hiệu cho OsNRT2.3b (AK072215)
<400> 38
tcgaagcggt cgtagaag 18
<210> 39
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi xuôi dùng để phân tích PCR định lượng đặc hiệu cho OsActin (NM_197297)
<400> 39
ttatggttgg gatgggaca 19
<210> 40
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi ngược dùng để phân tích PCR định lượng đặc hiệu cho OsActin (NM_197297)
<400> 40
agcacggctt gaatagcg 18
<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 41
Phe Phe Val Gly Phe Ser Leu Ala Asn Phe
1 5 10
<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 42
Glu Ile Leu Ile Gly Gly Leu Gly Asn
1 5
<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Arabidopsis lyrata
<400> 43
Phe Phe Val Gly Phe Ser Leu Ala Asn Phe
1 5 10
<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Arabidopsis lyrata
<400> 44
Glu Ile Leu Ile Gly Gly Leu Gly Asn
1 5
<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Capsella rubella
<400> 45
Phe Phe Val Gly Phe Ser Leu Ala Asn Phe
1 5 10
<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Capsella rubella
<400> 46
Glu Ile Leu Ile Gly Gly Leu Gly Asn
1 5
<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Capsella rubella
<400> 47
Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5
<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Capsella rubella
<400> 48
Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5
<210> 49
<211> 7

<212> PRT
<213> Populus trichocarpa
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(7)
<223> Potri.009G008500
<400> 49
Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5
<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Populus trichocarpa
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(9)
<223> Potri.009G008500
<400> 50
Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5
<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Populus trichocarpa
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(7)
<223> Potri.009G008600
<400> 51
Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5
<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Populus trichocarpa
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(9)
<223> Potri.009G008600
<400> 52
Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5
<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Cucumis sativus
<400> 53
Trp Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe
1 5 10
<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Cucumis sativus
<400> 54
Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe
1 5 10
<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Malus domestica
<400> 55
Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5
<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Malus domestica
<400> 56
Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5
<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Prunus persica
<400> 57
Phe Ser Val Ala Ser Pro Ile
1 5

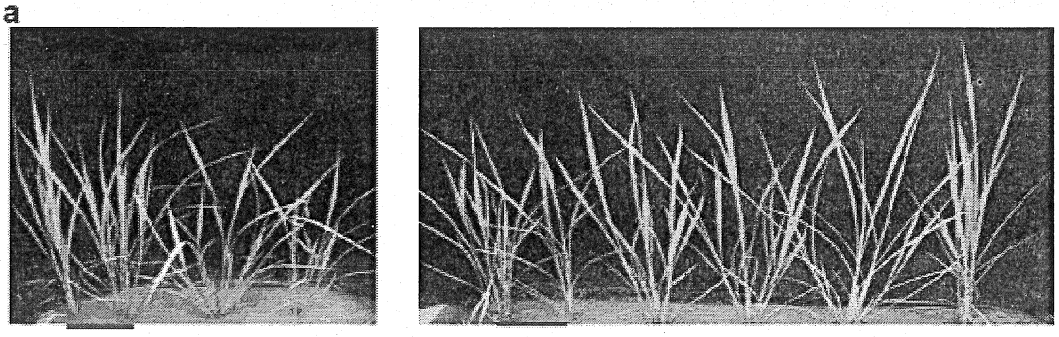
<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Prunus persica
<400> 58
Leu Trp Ile Ile Gln Thr Ala Gly Gly
1 5
<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Glycine max
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(10)
<223> Glyma13g39850
<400> 59
Trp Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe
1 5 10
<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Glycine max
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(11)
<223> Glyma13g39850
<400> 60
Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe
1 5 10
<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Glycine max
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(10)
<223> Glyma12g30050
<400> 61
Trp Arg Ile Ala Phe Phe Val Pro Gly Phe
1 5 10
<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Glycine max
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (1)..(11)
<223> Glyma12g30050
<400> 62
Leu Trp Ile Leu Gln Thr Leu Gly Gly Val Phe
1 5 10
<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Brachypodium distachyon
<400> 63
Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe
1 5 10
<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Brachypodium distachyon
<400> 64
Leu Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly
1 5
<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
<400> 65
Phe Phe Ile Pro Gly Val Met Gln Thr Phe
1 5 10
<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
<400> 66

Leu Trp Val Val Gln Thr Ile Gly Gly
1 5
<210> 67
<211> 2000
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 67
gagcgccggc ctcccaccgg tcgcgtaaga tcacgcccga aatctttatt cattttctct 60
ccaccggttg ccctctcgcc gcacccaacc atcgcgccac gccgcgccgc gctgccggag 120
ccgcgctttc cgctatgcta taagagctga cgcgcagggc acagcggatg tacgtacaca 180
cagtcactag ctaagctgct agccttgcta ccacgtgttg gagatggagg ctaagccggt 240
ggcgatggag gtggaggggg tcgaggcggc ggggggcaag ccgcggttca ggatgccggt 300
ggactccgac ctcaaggcga cggagttctg gctcttctcc ttcgcgaggc cacacatggc 360
ctccttccac atggcgtggt tctccttctt ctgctgcttc gtgtccacgt tcgccgtgtt 420
cgcgcgtctg gccatgggca cggcgtgcga cctggtcggg cccaggctgg cctccgcgtc 480
tctgatcctc ctcaccacac cggcggtgta ctgctcctcc atcatccagt ccccgtcggg 540
gtacctcctc gtgcgcttct tcacgggcat ctcgctggcg tcgttcgtgt cggcgcagtt 600
ctggatgagc tccatgttct cggcccccaa agtggggctg gccaacggcg tggccggcgg 660
ctggggcaac ctcggcggcg gcgccgtcca gctgctcatg ccgctcgtgt acgaggccat 720
ccacaagatc ggtagcacgc cgttcacggc gtggcgcatc gccttcttca tcccgggcct 780
gatgcagacg ttctcggcca tcgccgtgct ggcgttcggg caggacatgc ccggcggcaa 840
ctacgggaag ctccacaaga ctggcgacat gcacaaggac agcttcggca acgtgctgcg 900
ccacgccctc accaactacc gcggctggat cctggcgctc acctacggct acagcttcgg 960
cgtcgagctc accatcgaca acgtcgtgca ccagtacttc tacgaccgct tcgacgtcaa 1020
cctccagacc gccgggctca tcgccgccag cttcgggatg gccaacatca tctcccgccc 1080
cggcggcggg ctactctccg actggctctc cagccggtac ggcatgcgcg gcaggctgtg 1140
ggggctgtgg actgtgcaga ccatcggcgg cgtcctctgc gtggtgctcg gaatcgtcga 1200
cttctccttc gccgcgtccg tcgccgtgat ggtgctcttc tccttcttcg tccaggccgc 1260
gtgcgggctc accttcggca tcgtgccgtt cgtgtcgcgg aggtcgctgg ggctcatctc 1320
cgggatgacc ggcggcgggg gcaacgtggg cgccgtgctg acgcagtaca tcttcttcca 1380
cggcacaaag tacaagacgg agaccgggat caagtacatg gggctcatga tcatcgcgtg 1440
cacgctgccc gtcatgctca tctacttccc gcagtggggc ggcatgctcg taggcccgag 1500
gaagggggcc acggcggagg agtactacag ccgggagtgg tcggatcacg agcgcgagaa 1560
gggtttcaac gcggccagcg tgcggttcgc ggagaacagc gtgcgcgagg gcgggaggtc 1620
gtcggcgaat ggcggacagc ccaggcacac cgtccccgtc gacgcgtcgc cggccggggt 1680
gtgaagaatg ccacggacaa taaggtcgcg gttgtagtac aactgtacaa attgatggta 1740
cgtgtcgttt gaccgcgcgc gcgcacagtg tgggtcgtgg cctcgtgggc ttagtggagt 1800
acagtgaggg gtgtacgtgt gtcgtggcgc gcgcggtcac ctcggtggcc ttgggattgg 1860
gggggcacta tacgctagta ctccagatat atacgggttt gatttacttc tgtggatcgg 1920
cgcttgttgg tggtttgctc cctgtggttt ttgtgatggt aatcatactc atactcaaac 1980
agtcaaaact ttttgatgcg 2000
<210> 68
<211> 1893
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 68
agtcactagc taagctgcta gccttgctac cacgtgttgg agatggaggc taagccggtg 60
gcgatggagg tggaggggt cgaggcggcg gggggcaagc cgcggttcag gatgccggtg 120
gactccgacc tcaaggcgac ggagttctgg ctcttctcct tcgcgaggcc acacatggcc 180
tccttccaca tggcgtggtt ctccttcttc tgctgcttcg tgtccacgtt cgccgcgccg 240
ccgctgctgc cgctcatccg cgacaccctc gggctcacgg ccacggacat cggcaacgcc 300
gggatcgcgt ccgtgtcggg cgccgtgttc gcgcgtctgg ccatgggcac ggcgtgcgac 360
ctggtcgggc ccaggctggc ctccgcgtct ctgatcctcc tcaccacacc ggcggtgtac 420
tgctcctcca tcatccagtc cccgtcgggg tacctcctcg tgcgcttctt cacgggcatc 480
tcgctggcgt cgttcgtgtc ggcgcagttc tggatgagct ccatgttctc ggcccccaaa 540
gtggggctgg ccaacggcgt ggccggcggc tggggcaacc tcggcggcgg cgccgtccag 600
ctgctcatgc cgctcgtgta cgaggccatc cacaagatcg gtagcacgcc gttcacggcg 660
tggcgcatcg ccttcttcat cccgggcctg atgcagacgt tctcggccat cgccgtgctg 720
gcgttcgggc aggacatgcc cggcggcaac tacgggaagc tccacaagac tggcgacatg 780
cacaaggaca gcttcggcaa cgtgctgcgc cacgccctca ccaactaccg cggctggatc 840
ctggcgctca cctacggcta cagcttcggc gtcgagctca ccatcgacaa cgtcgtgcac 900
cagtacttct acgaccgctt cgacgtcaac ctccagaccg ccgggctcat cgccgccagc 960
ttcgggatgg ccaacatcat ctcccgcccc ggcggcgggc tactctccga ctggctctcc 1020
agccggtacg gcatgcgcgg caggctgtgg gggctgtgga ctgtgcagac catcggcggc 1080
gtcctctgcg tggtgctcgg aatcgtcgac ttctccttcg ccgcgtccgt cgccgtgatg 1140
gtgctcttct ccttcttcgt ccaggccgcg tgcgggctca ccttcggcat cgtgccgttc 1200
gtgtcgcgga ggtcgctggg gctcatctcc gggatgaccg gcggcggggg caacgtgggc 1260
gccgtgctga cgcagtacat cttcttccac ggcacaaagt acaagacgga gaccgggatc 1320
aagtacatgg ggctcatgat catcgcgtgc acgctgcccg tcatgctcat ctacttcccg 1380
cagtggggcg gcatgctcgt aggcccgagg aagggggcca cggcggagga gtactacagc 1440
cgggagtggt cggatcacga gcgcgagaag ggtttcaacg cggccagcgt gcggttcgcg 1500
gagaacagcg tgcgcgaggg cgggaggtcg tcggcgaatg gcggacagcc caggcacacc 1560
gtccccgtcg acgcgtcgcc ggccggggtg tgaagaatgc cacggacaat aaggtcgcgg 1620
ttgtagtaca actgtacaaa ttgatggtac gtgtcgtttg accgcgcgcg cgcacagtgt 1680
gggtcgtggc ctcgtgggct tagtggagta cagtgagggg tgtacgtgtg tcgtggcgcg 1740
cgcggtcacc tcggtggcct tgggattggg ggggcactat acgctagtac tccagatata 1800
tacgggtttg atttacttct gtggatcggc gcttgttggt ggtttgctcc ctgtggtttt 1860

tgtgatggta atcatactca tactcaaaca gtc 1893

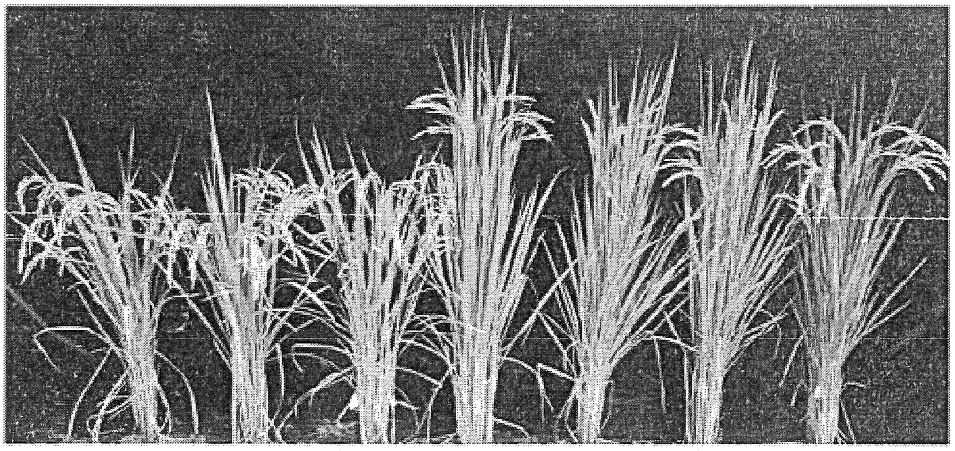
Fig.1

a



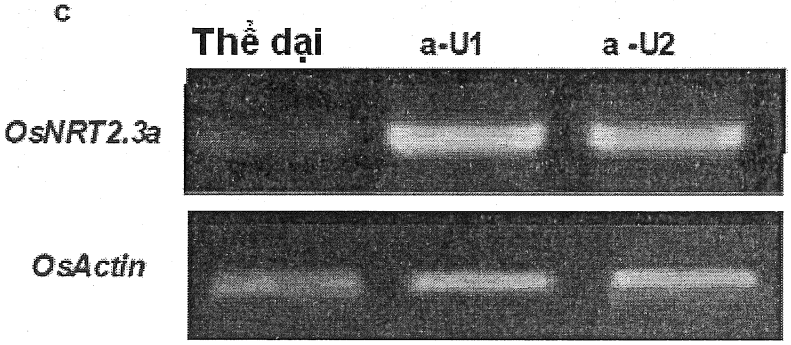
Thể dại a-U1 Thể dại b-U1 b-U2 b-S2

b



WT a-U1 a-U2 b-S2 b-S6 b-U1 b-U2

c



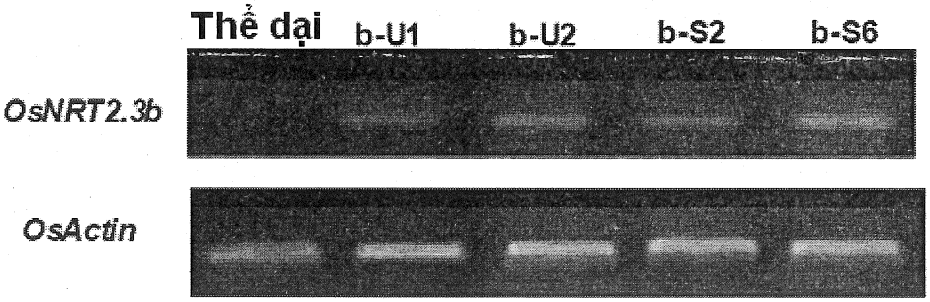


Fig.1

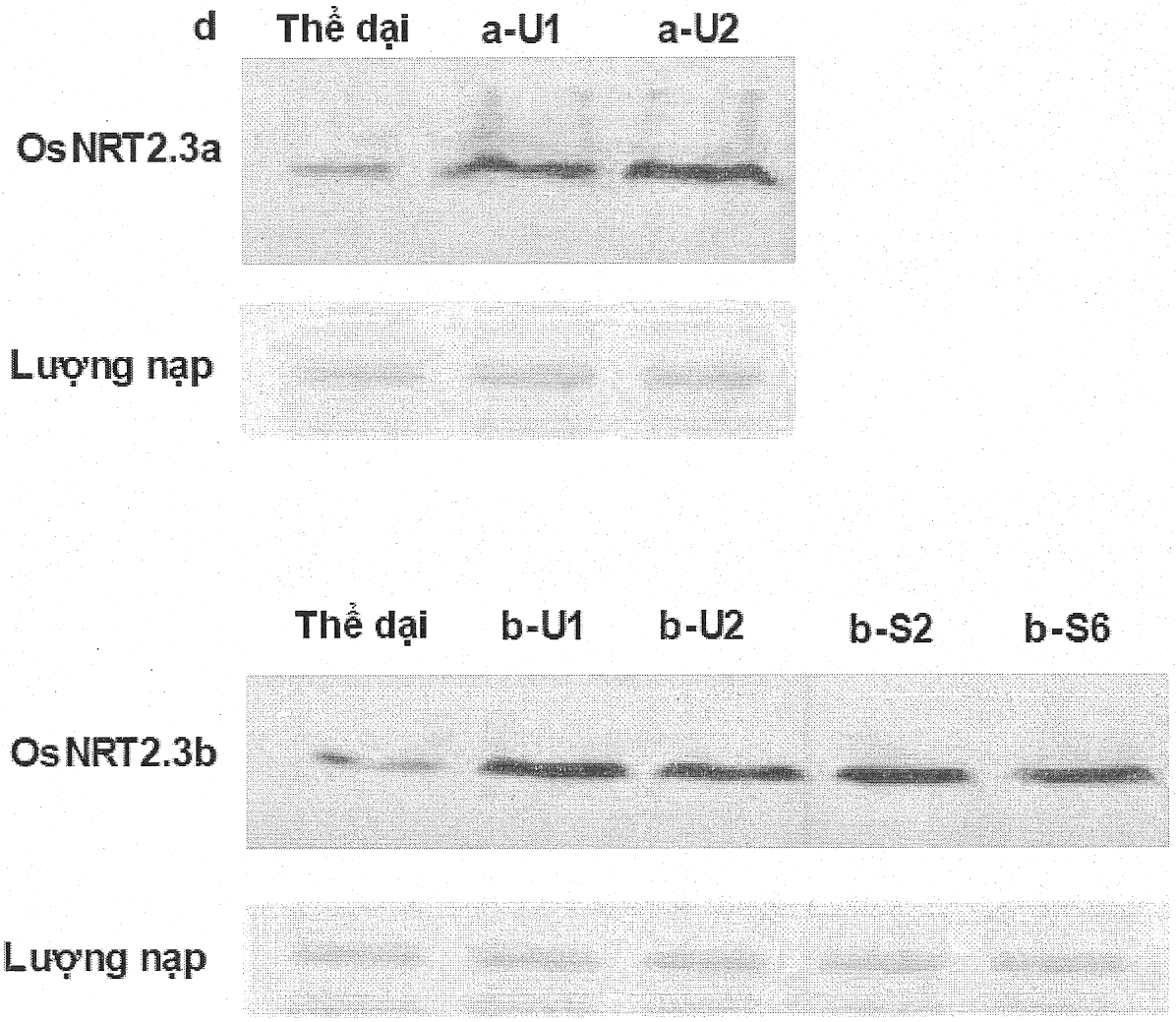
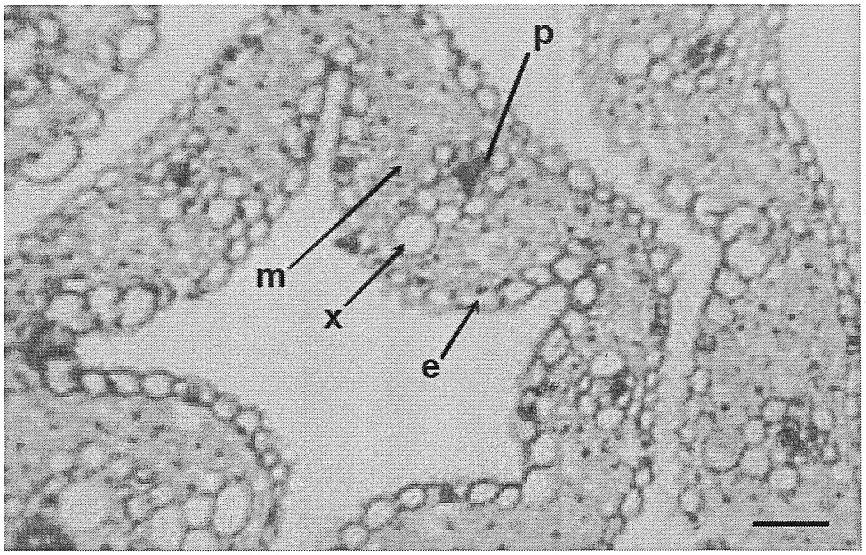

d
Thể dại
a-U1
a-U2
OsNRT2.3a
Lượng nạp
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6
OsNRT2.3b
Lượng nạp

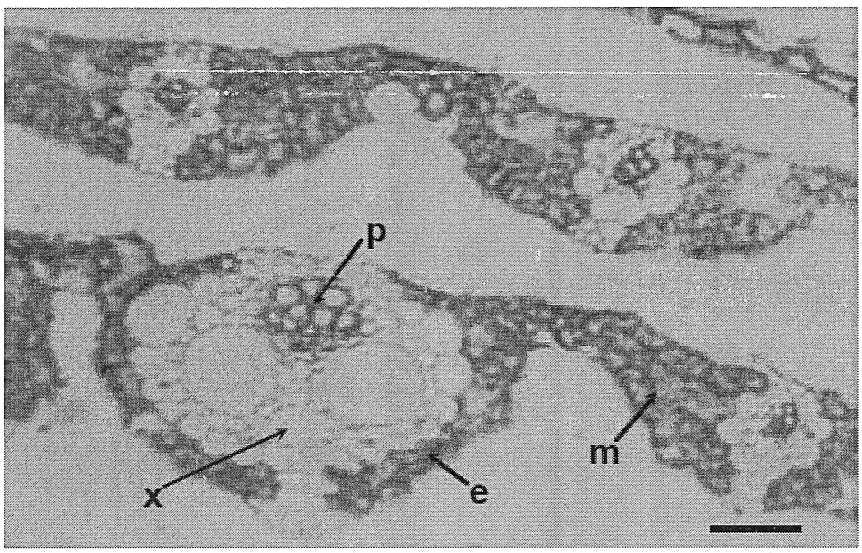
Fig.1

e

Thể dại



b-S6



Mẫu đối chứng âm

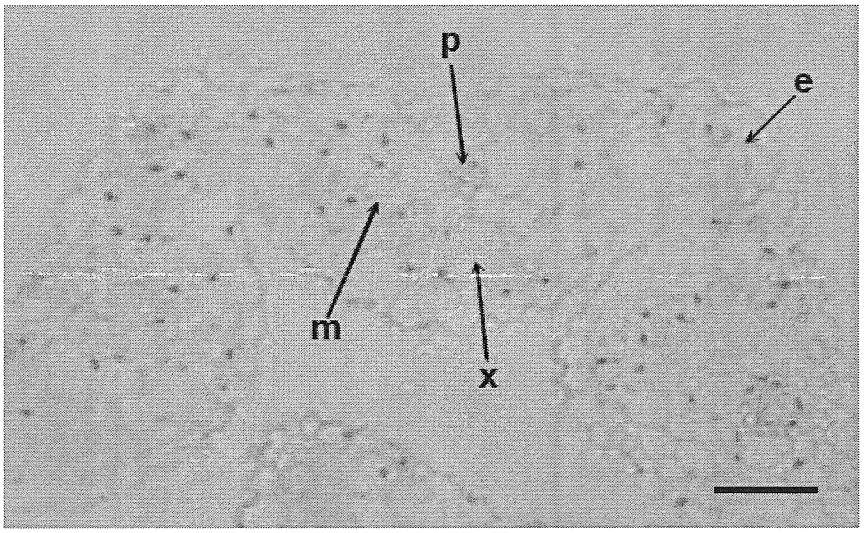


Fig.2

a

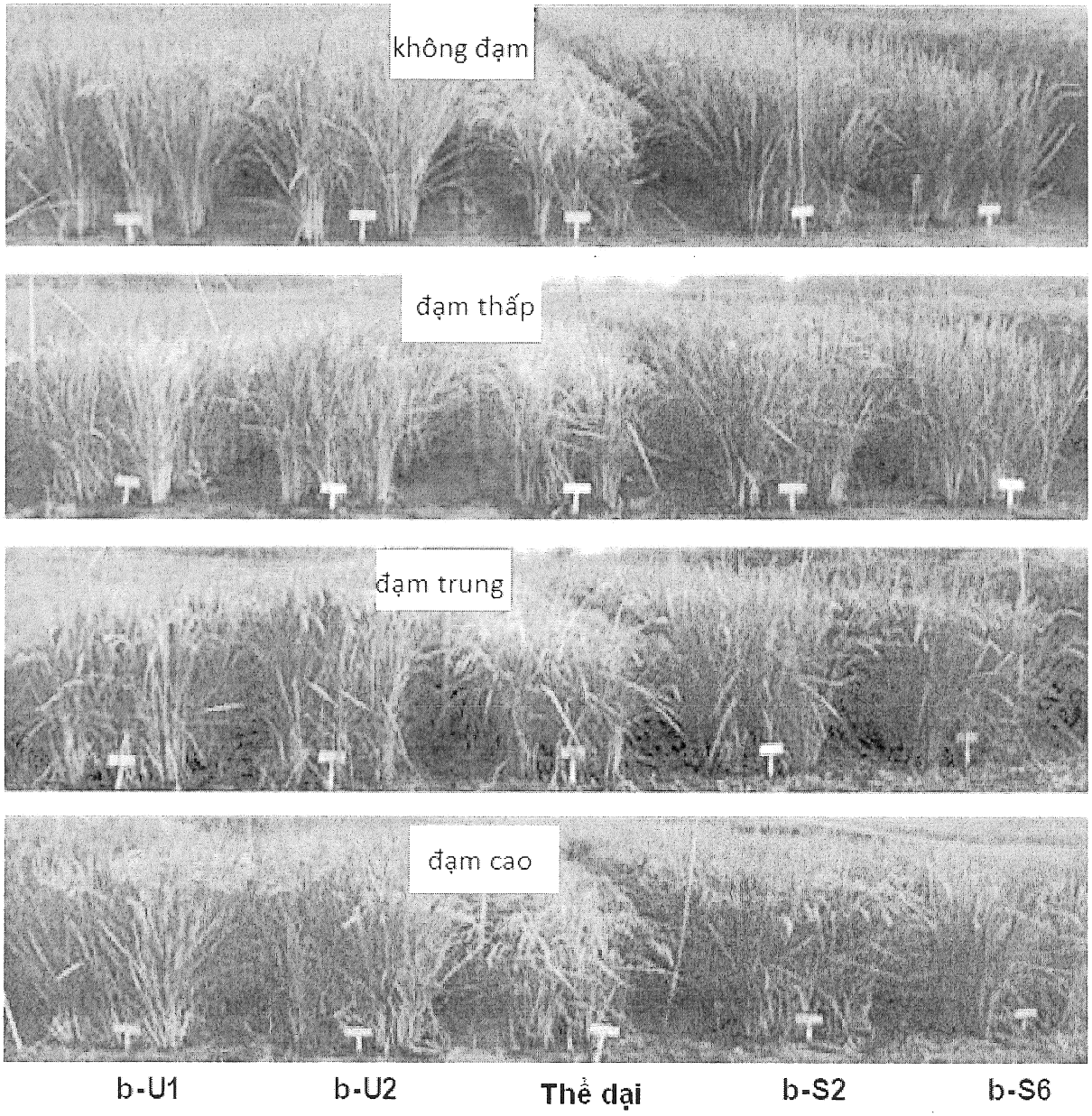
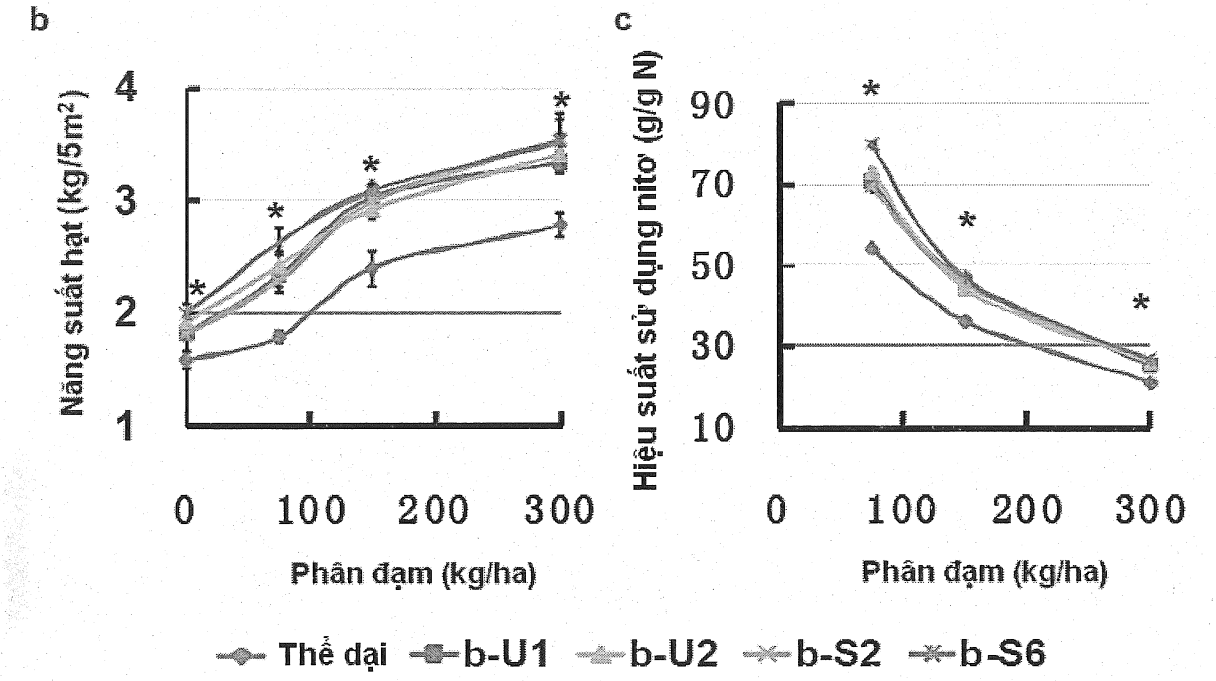
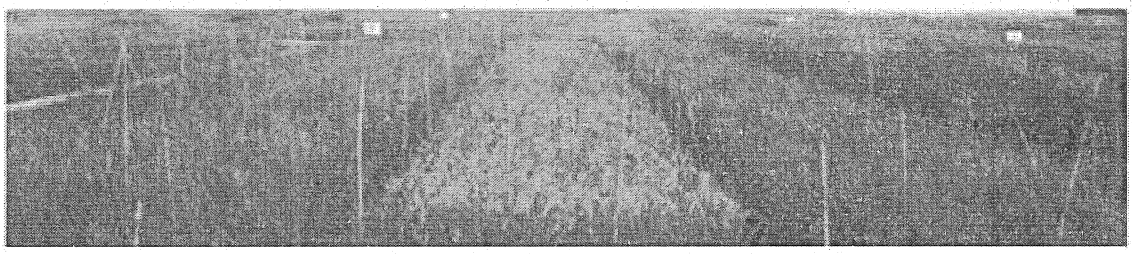


Fig.2

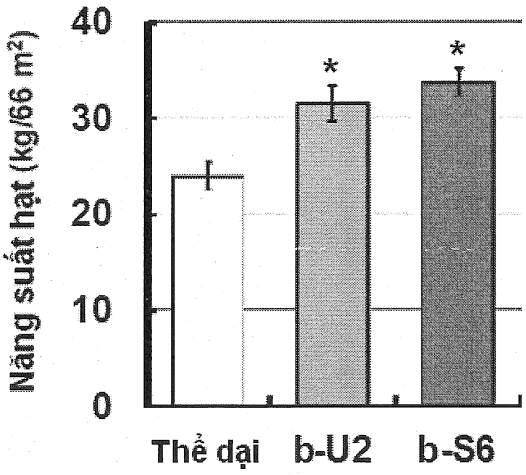


d



b-U2 Thể dại b-S6

e



f

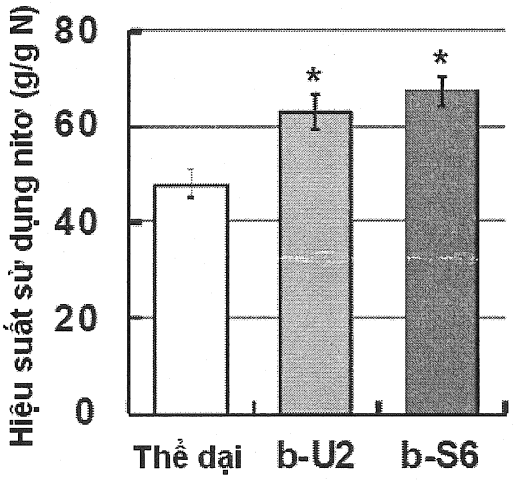
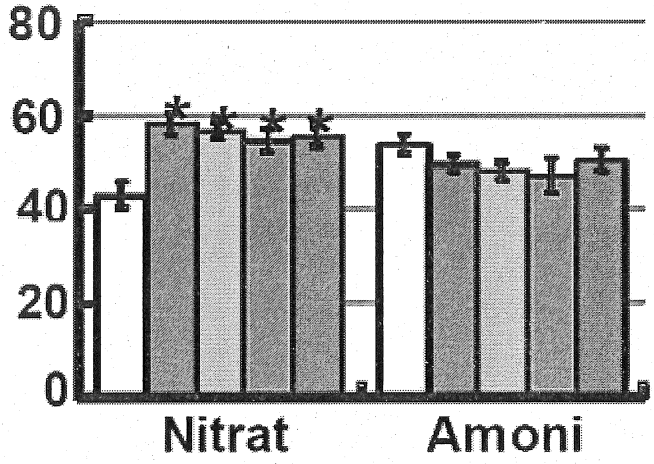
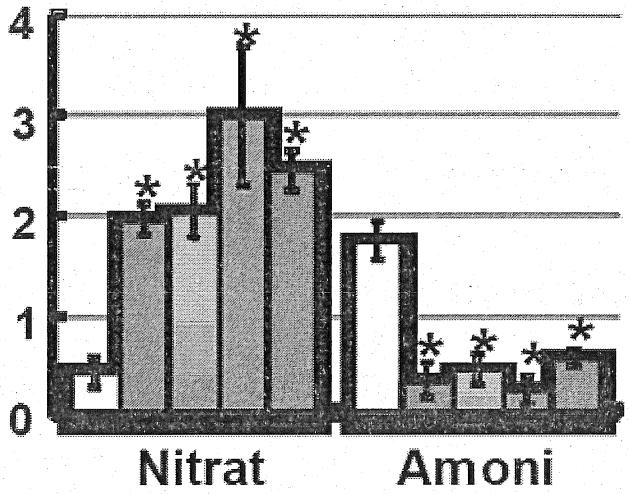


Fig.3

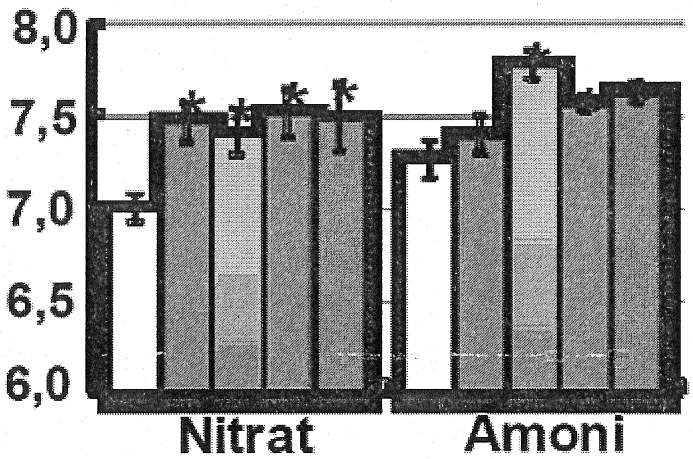
a



b



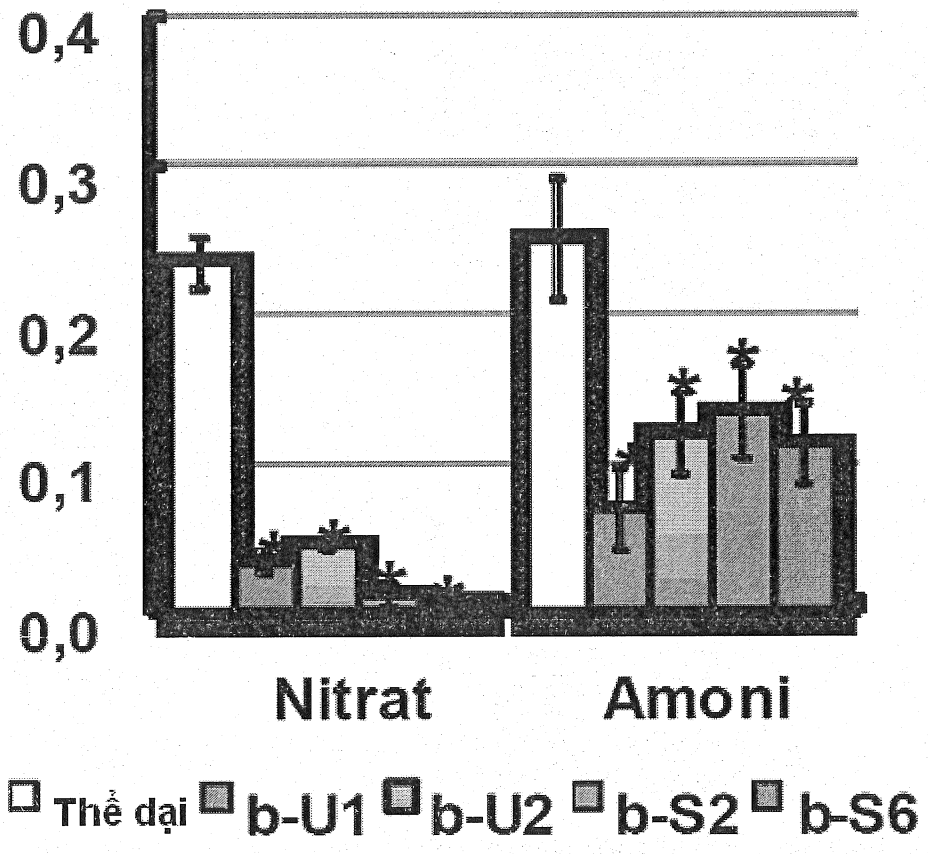
c



Thể dại b-U1 b-U2 b-S2 b-S6

Fig.3

d


0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Nitrat
Amoni
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6

e

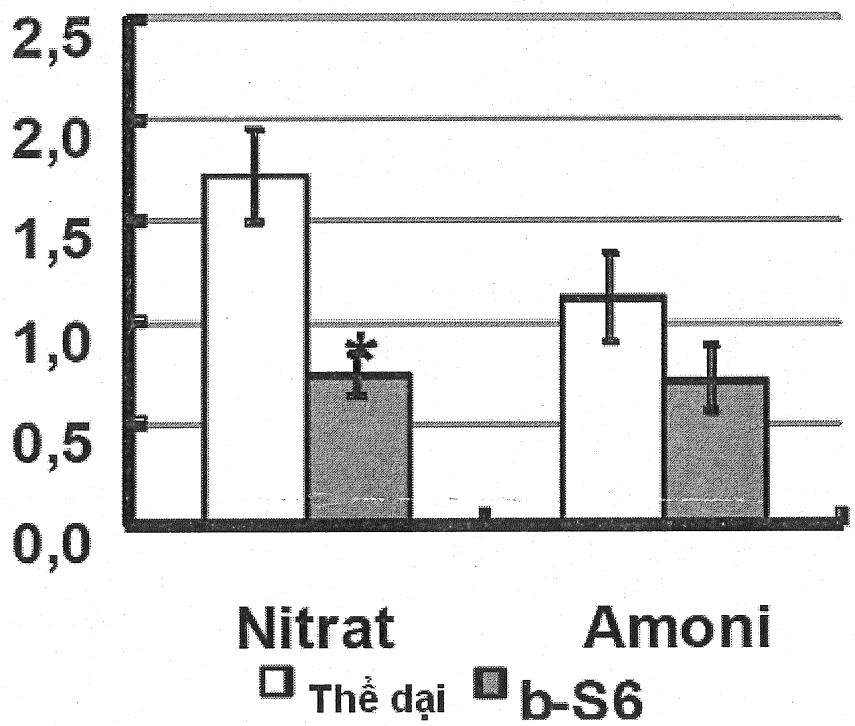

2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Nitrat
Amoni
Thể dại
b-S6

Fig.4

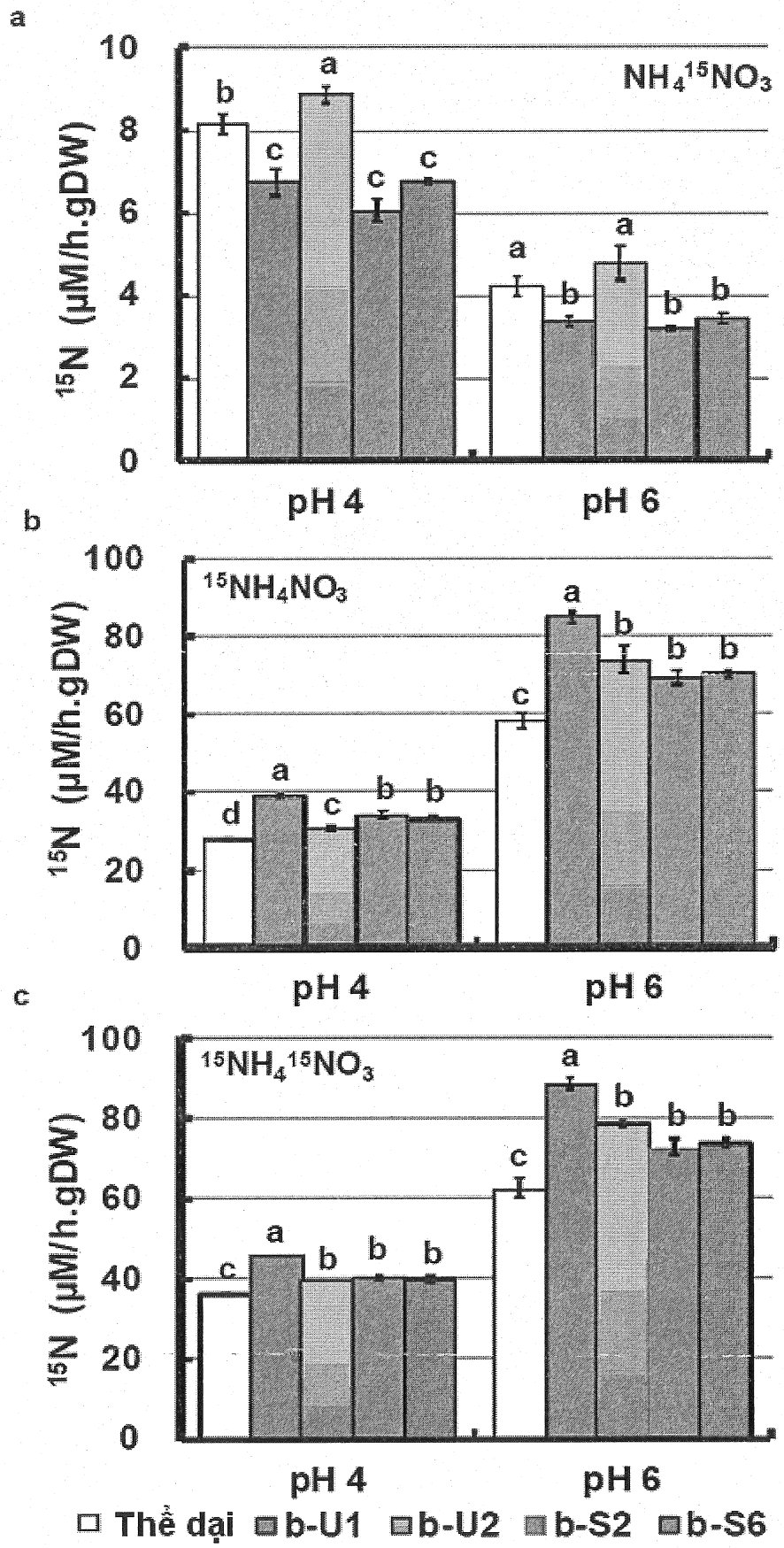
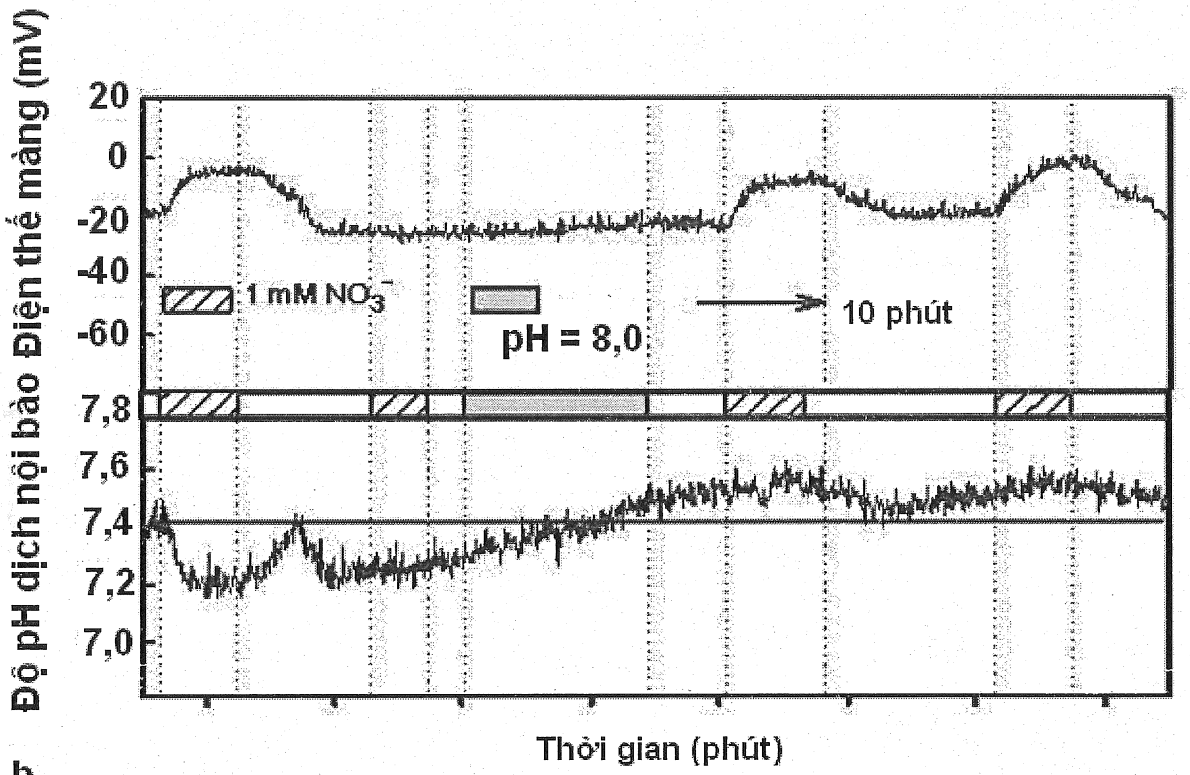

a
$NH_4{}^{15}NO_3$
^{15}N (µM/h.gDW)
pH 4
pH 6
b
$^{15}NH_4NO_3$
^{15}N (µM/h.gDW)
pH 4
pH 6
c
$^{15}NH_4{}^{15}NO_3$
^{15}N (µM/h.gDW)
pH 4
pH 6
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6

Fig.5

a


Độ pH dịch nội bào Điện thế màng (mV)
20
0
-20
-40
-60
7,8
7,6
7,4
7,2
7,0
1 mM NO_3^-
pH = 8,0
10 phút
Thời gian (phút)

b

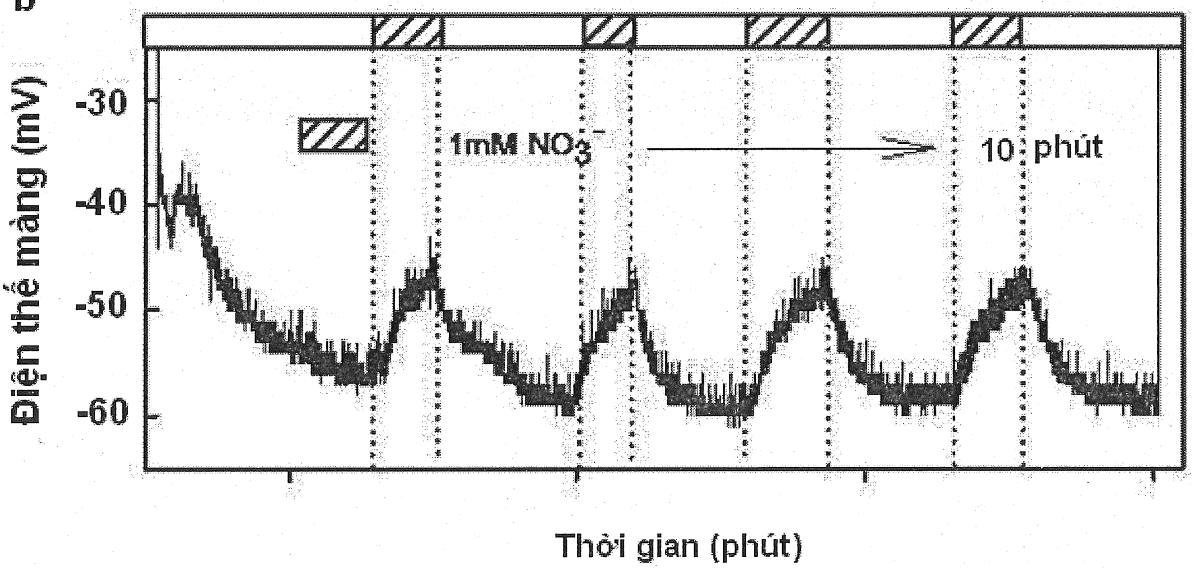
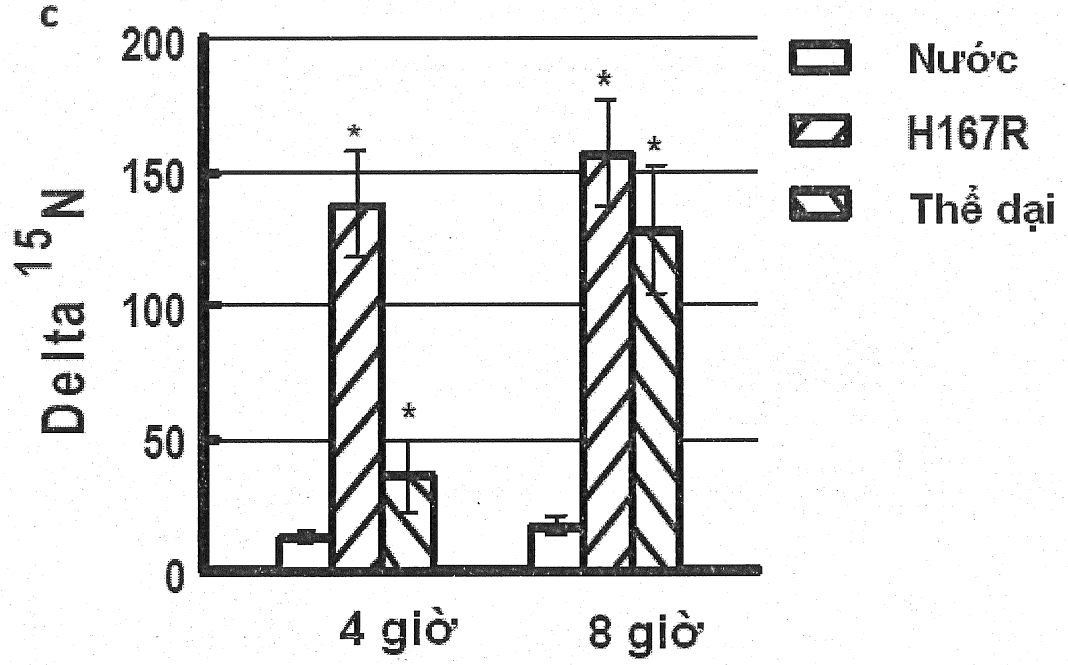

Điện thế màng (mV)
-30
-40
-50
-60
1mM NO_3^-
10 phút
Thời gian (phút)

Fig.5

c


200
150
100
50
0
Delta 15N
*
*
*
*
Nước
H167R
Thể dại
4 giờ
8 giờ

d

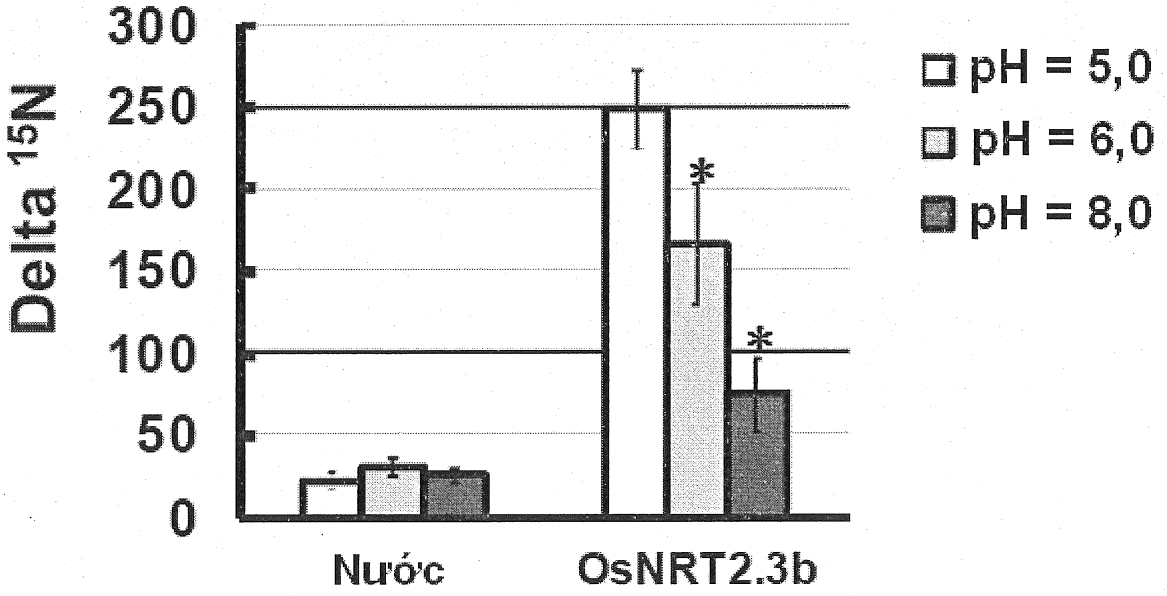
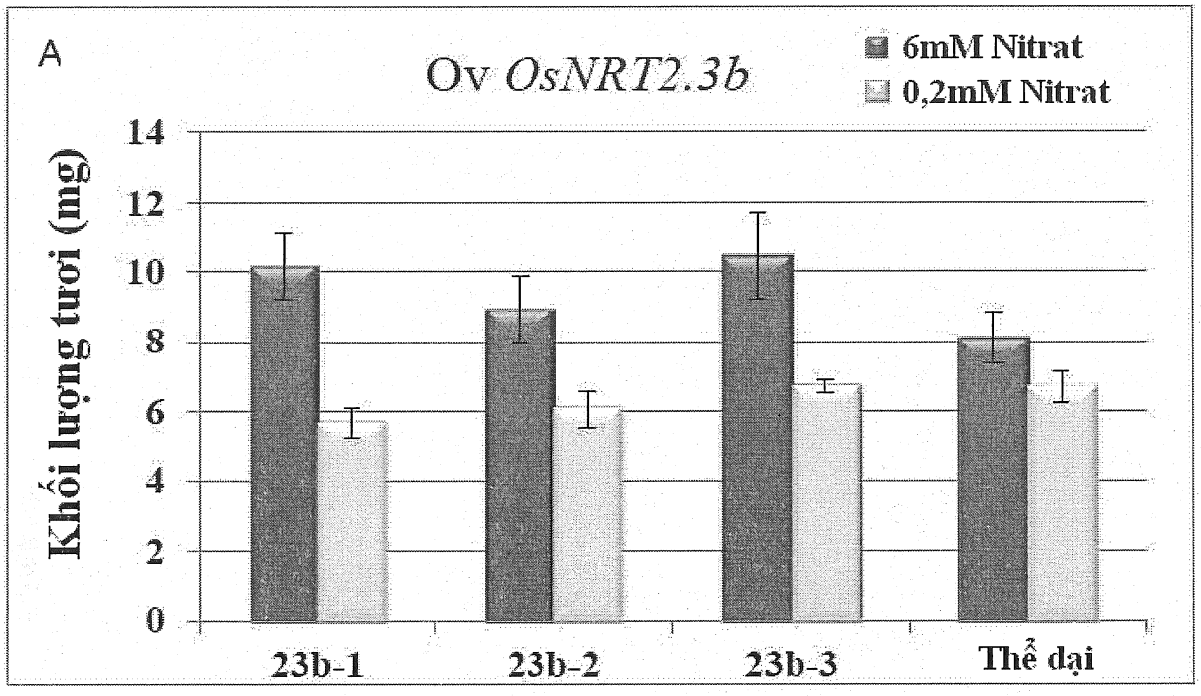

300
250
200
150
100
50
0
Delta 15N
*
*
pH = 5,0
pH = 6,0
pH = 8,0
Nước
OsNRT2.3b

Fig.6


A
Ov OsNRT2.3b
6mM Nitrat
0,2mM Nitrat
Khối lượng tươi (mg)
14
12
10
8
6
4
2
0
23b-1
23b-2
23b-3
Thể dại

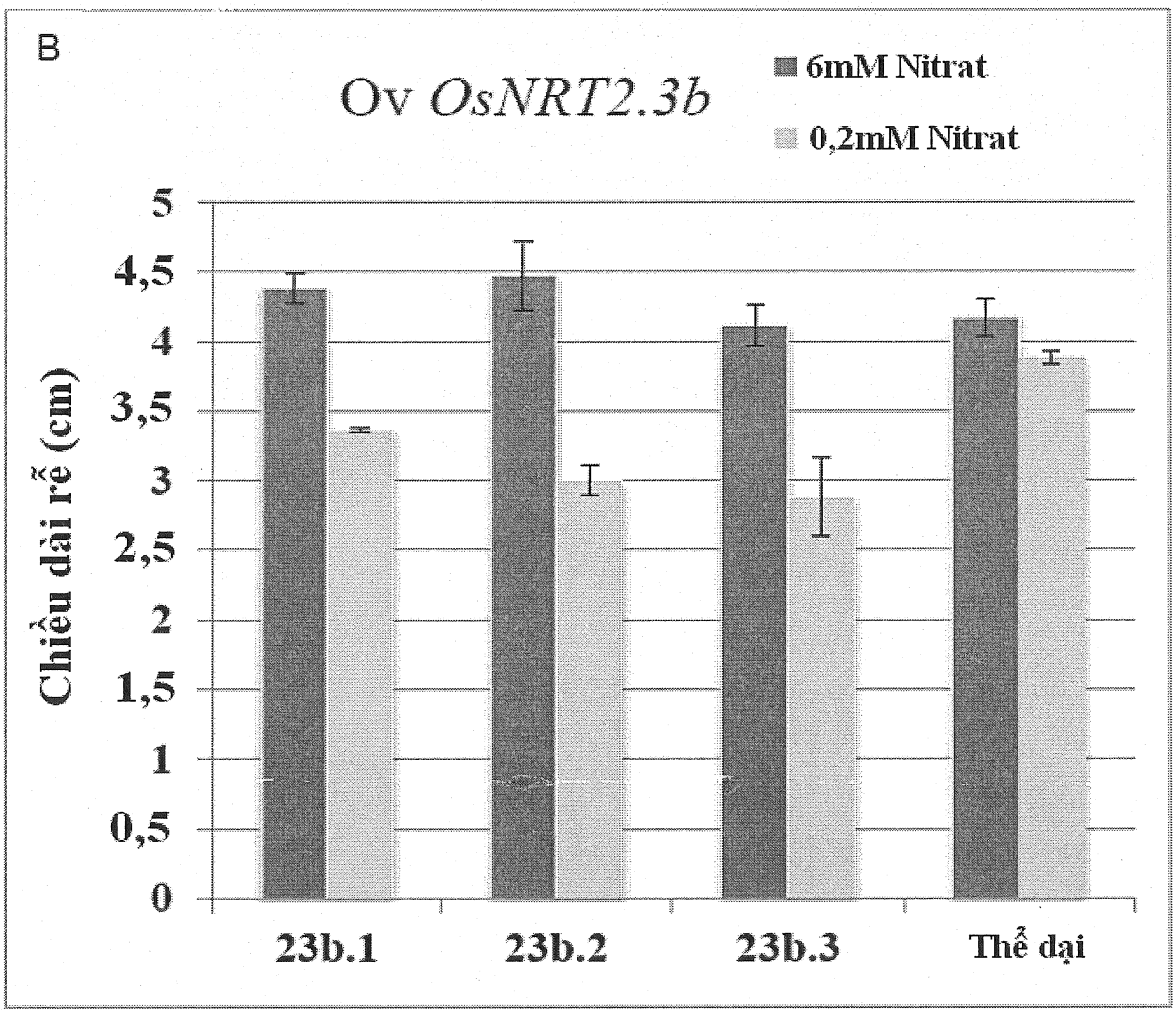

B
Ov OsNRT2.3b
6mM Nitrat
0,2mM Nitrat
Chiều dài rễ (cm)
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
23b.1
23b.2
23b.3
Thể dại

Fig.6

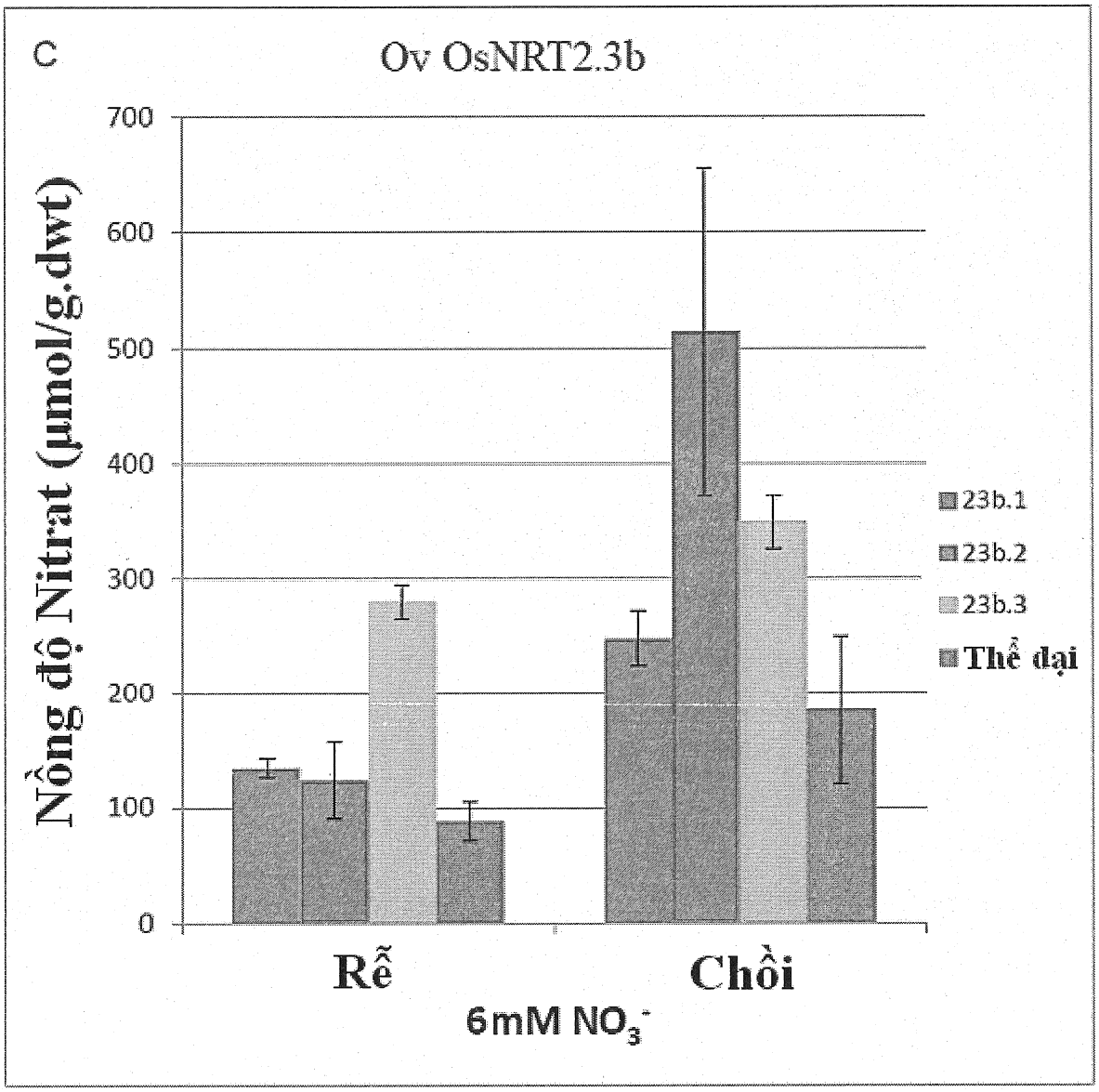
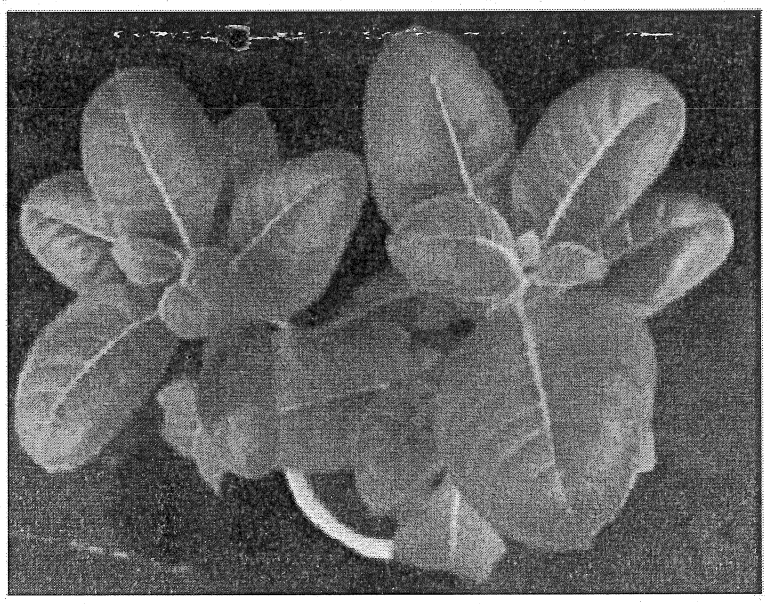

C
Ov OsNRT2.3b
Nồng độ Nitrat (µmol/g.dwt)
700
600
500
400
300
200
100
0
23b.1
23b.2
23b.3
Thể dại
Rễ
Chồi
6mM NO3-

Fig.7

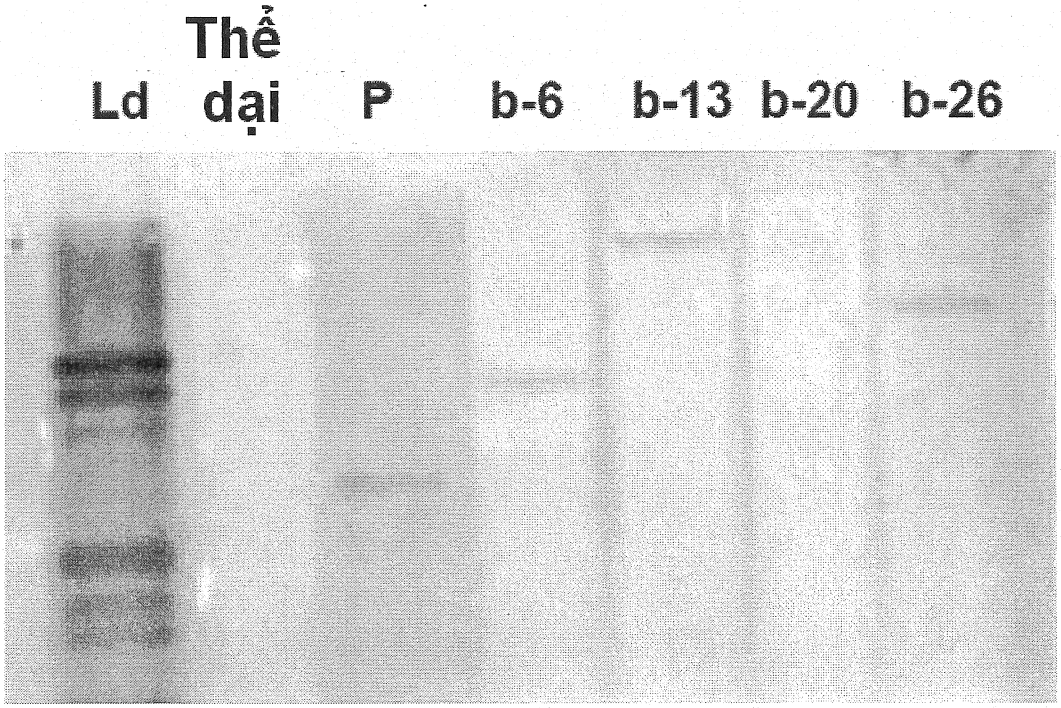


Thể dại b-6

Thể dại b-6 b-13 b-26

Fig.8

A



B

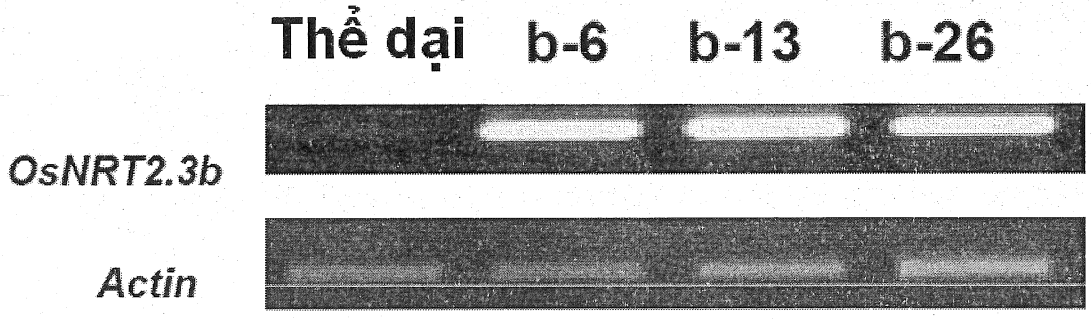


Fig.9

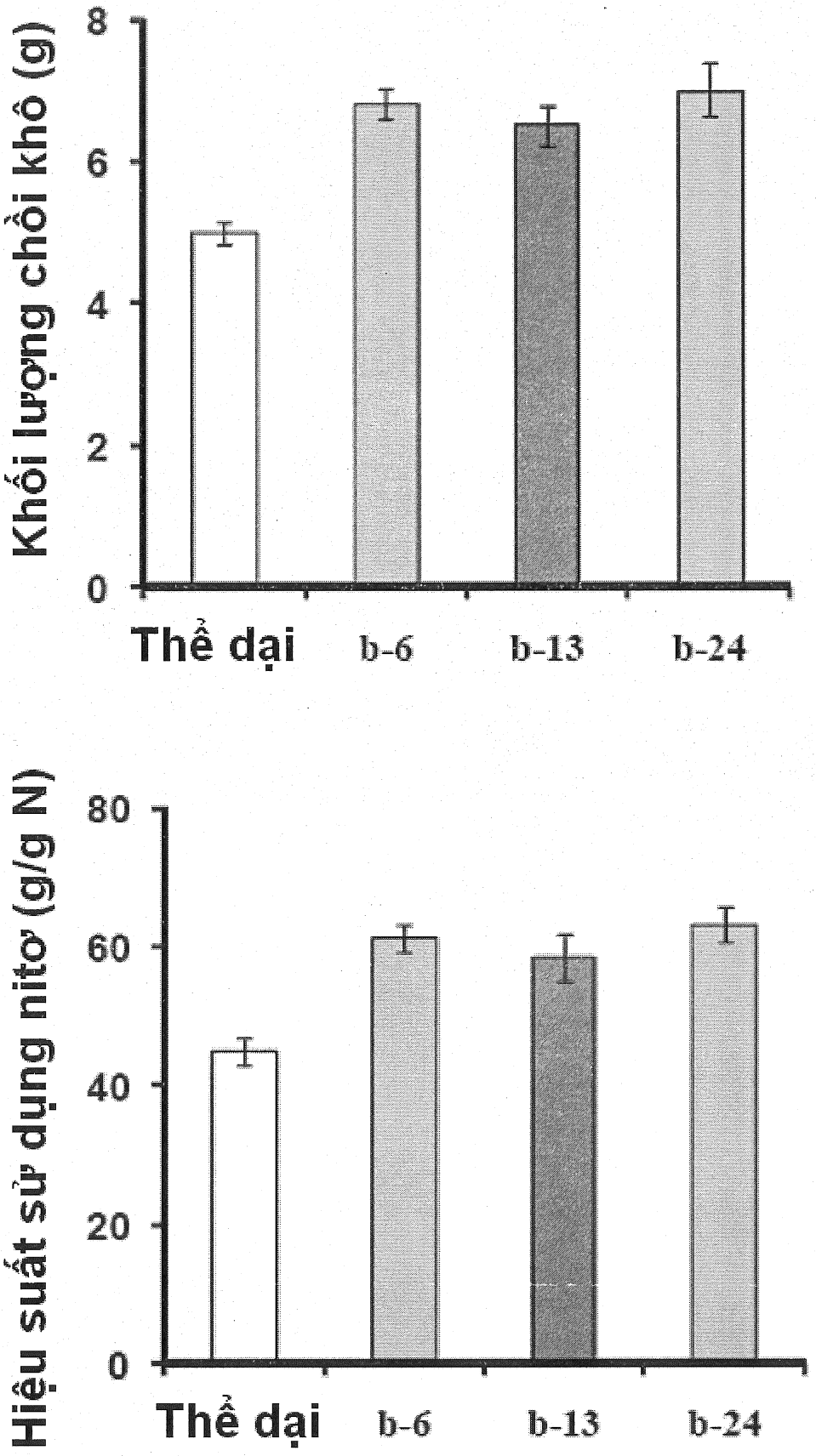
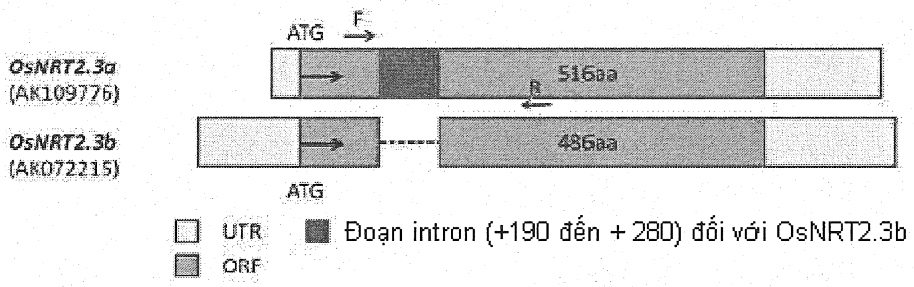

Khối lượng chồi khô (g)
8
6
4
2
0
Thể dại
b-6
b-13
b-24
Hiệu suất sử dụng nitơ (g/g N)
80
60
40
20
0
Thể dại
b-6
b-13
b-24

Fig.10




```
OsNRT2.3a        MEAKPVAMEVEGVEAAGGKPRFRMPVDSDLKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV   60
OsNRT2.3b        MEAKPVAMEVEGVEAAGGKPRFRMPVDSDLKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV
Vùng liên ứng    MEAKPVAMEVEGVEAAGGKPRFRMPVDSDLKATEFWLFSFARPHMASFHMAWFSFFCCFV   60

OsNRT2.3a        STFAAPPLLPLIRDTLGLTATDIGNAGIASVSGAVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILL  120
OsNRT2.3b        STF                                AVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILL
Vùng liên ứng    STF--------------------AVFARLAMGTACDLVGPRLASASLILL   90

OsNRT2.3a        TTPAVYCSSIIQSPSGYLLVRFFTGISLASFVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNL  180
OsNRT2.3b        TTPAVYCSSIIQSPSGYLLVRFFTGISLASFVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNL
Vùng liên ứng    TTPAVYCSSIIQSPSGYLLVRFFTGISLASFVSAQFWMSSMFSAPKVGLANGVAGGWGNL  150

OsNRT2.3a        GGGAVQLLMPLVYEAIHKIGSTPFTAWRIAFFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKL  240
OsNRT2.3b        GGGAVQLLMPLVYEAIHKIGSTPFTAWRIAFFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKL
Vùng liên ứng    GGGAVQLLMPLVYEAIHKIGSTPFTAWRIAFFIPGLMQTFSAIAVLAFGQDMPGGNYGKL  210

OsNRT2.3a        HKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALTYGYSFGVELTIDNVVHQYFYDRFDVNLQTA  300
OsNRT2.3b        HKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALTYGYSFGVELTIDNVVHQYFYDRFDVNLQTA
Vùng liên ứng    HKTGDMHKDSFGNVLRHALTNYRGWILALTYGYSFGVELTIDNVVHQYFYDRFDVNLQTA  270

OsNRT2.3a        GLIAASFGMANIISRPGGGLLSDWLSSRYGMRGRLWGLWTVQTIGGVLCVVLGIVDFSFA  360
OsNRT2.3b        GLIAASFGMANIISRPGGGLLSDWLSSRYGMRGRLWGLWTVQTIGGVLCVVLGIVDFSFA
Vùng liên ứng    GLIAASFGMANIISRPGGGLLSDWLSSRYGMRGRLWGLWTVQTIGGVLCVVLGIVDFSFA  330

OsNRT2.3a        ASVAVMVLFSFFVQAACGLTFGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTKY  420
OsNRT2.3b        ASVAVMVLFSFFVQAACGLTFGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTKY
Vùng liên ứng    ASVAVMVLFSFFVQAACGLTFGIVPFVSRRSLGLISGMTGGGGNVGAVLTQYIFFHGTKY  390

OsNRT2.3a        KTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGGMLVGPRKGATAEEYYSREWSDHEREKGFNA  480
OsNRT2.3b        KTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGGMLVGPRKGATAEEYYSREWSDHEREKGFNA
Vùng liên ứng    KTETGIKYMGLMIIACTLPVMLIYFPQWGGMLVGPRKGATAEEYYSREWSDHEREKGFNA  450

OsNRT2.3a        ASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVDASPAGV   516
OsNRT2.3b        ASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVDASPAGV
Vùng liên ứng    ASVRFAENSVREGGRSSANGGQPRHTVPVDASPAGV   486
```

Fig.11

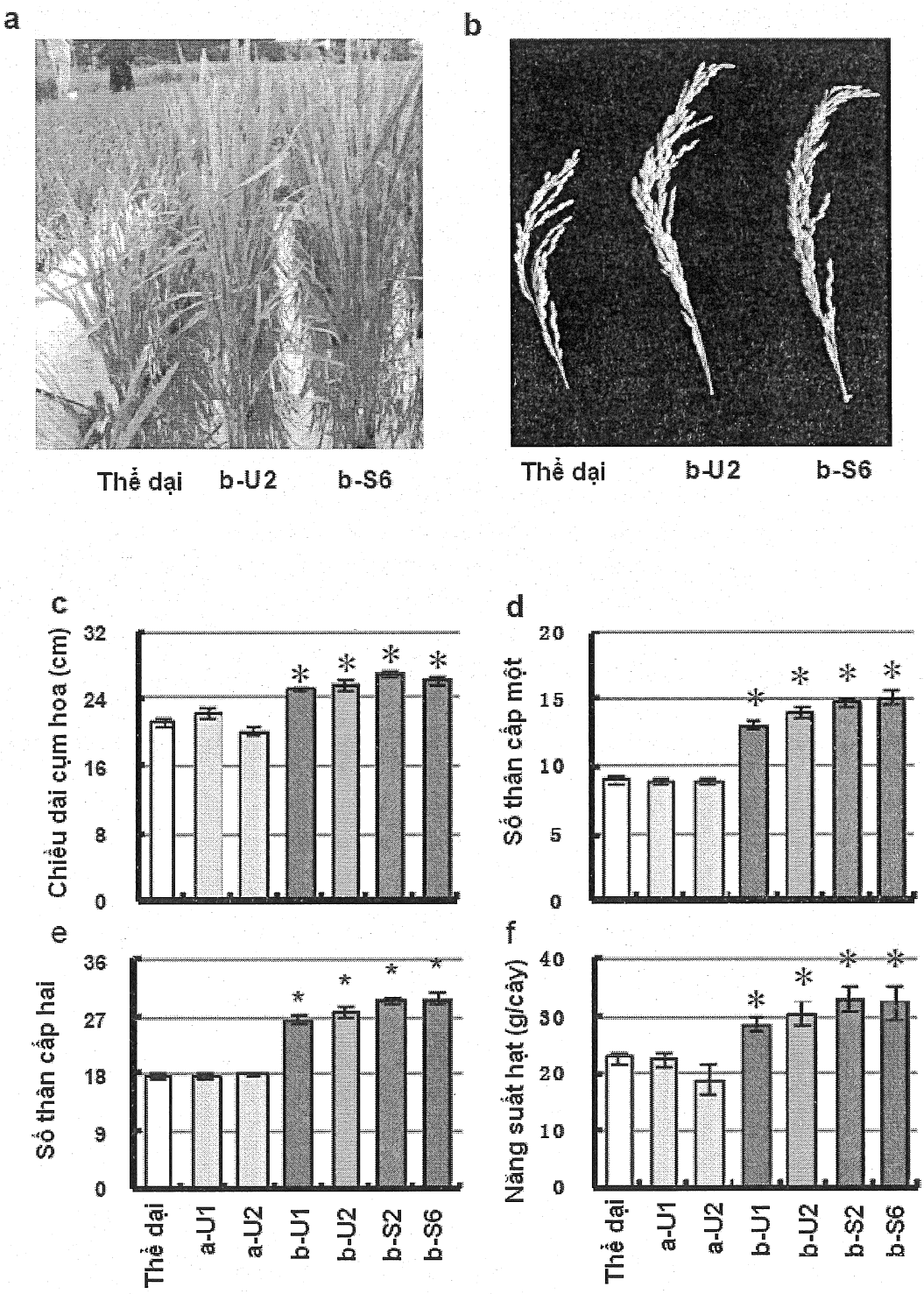
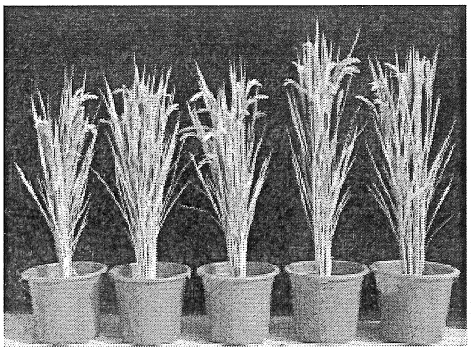

a
Thể dại
b-U2
b-S6
b
Thể dại
b-U2
b-S6
c
Chiều dài cụm hoa (cm)
32
24
16
8
0
d
Số thân cấp một
20
15
10
5
0
e
Số thân cấp hai
36
27
18
9
0
f
Năng suất hạt (g/cây)
40
30
20
10
0
Thể dại
a-U1
a-U2
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6

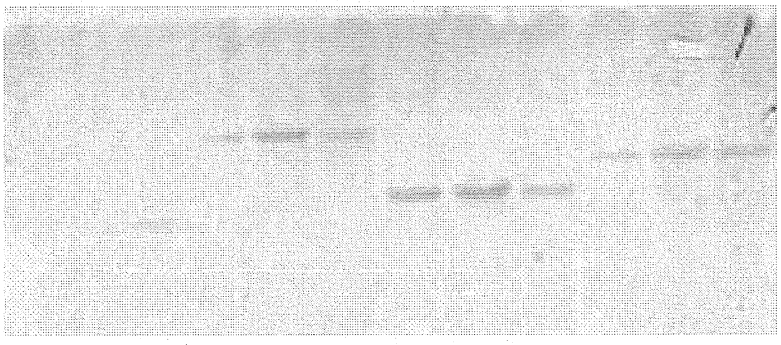
Fig.12

a



Thể dại 396-2 369-1 366-1 342-1

b

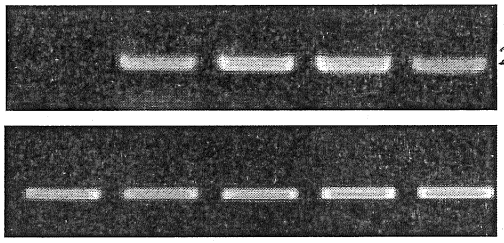


Thể dại 396 369 366 342

(1, 2) (1, 2, 3) (1, 2, 3) (1, 2, 3)

HindIII + BamHI

c

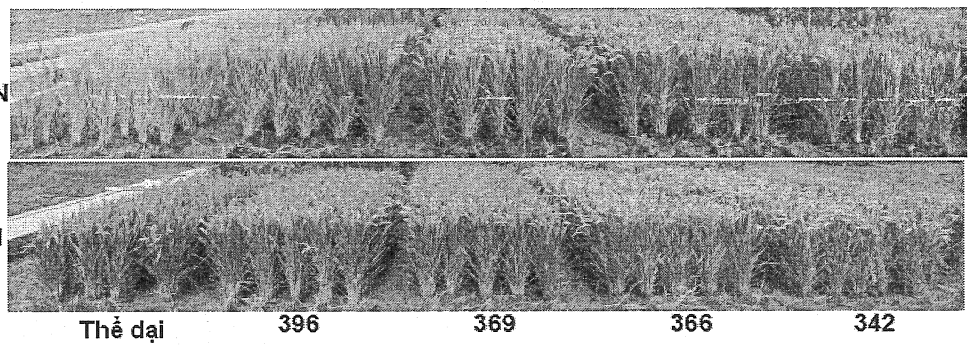


OsNRT2.3b 26 c

OsACT 26 c

Thể dại 396-2 369-1 366-1 342-1

d



110 Kg/haN

220Kg/ha N

Thể dại 396 369 366 342

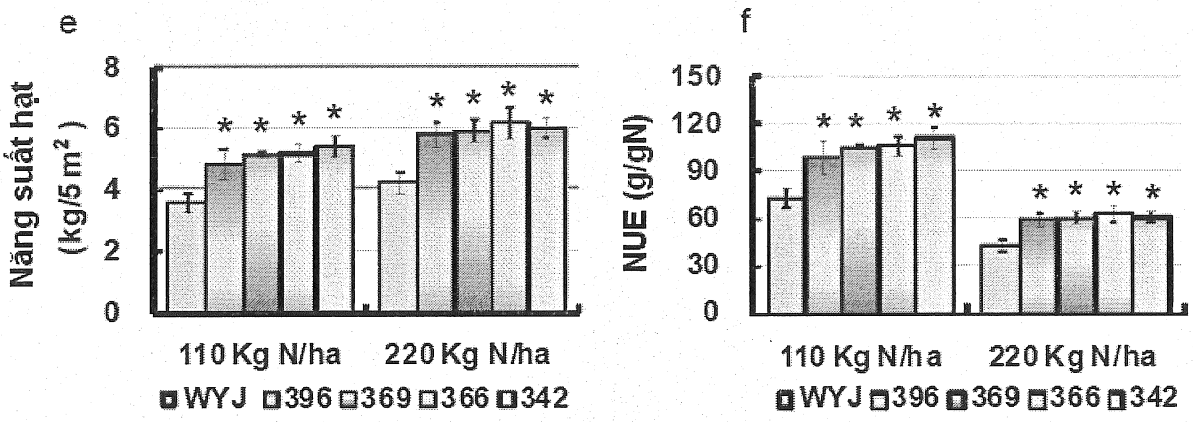
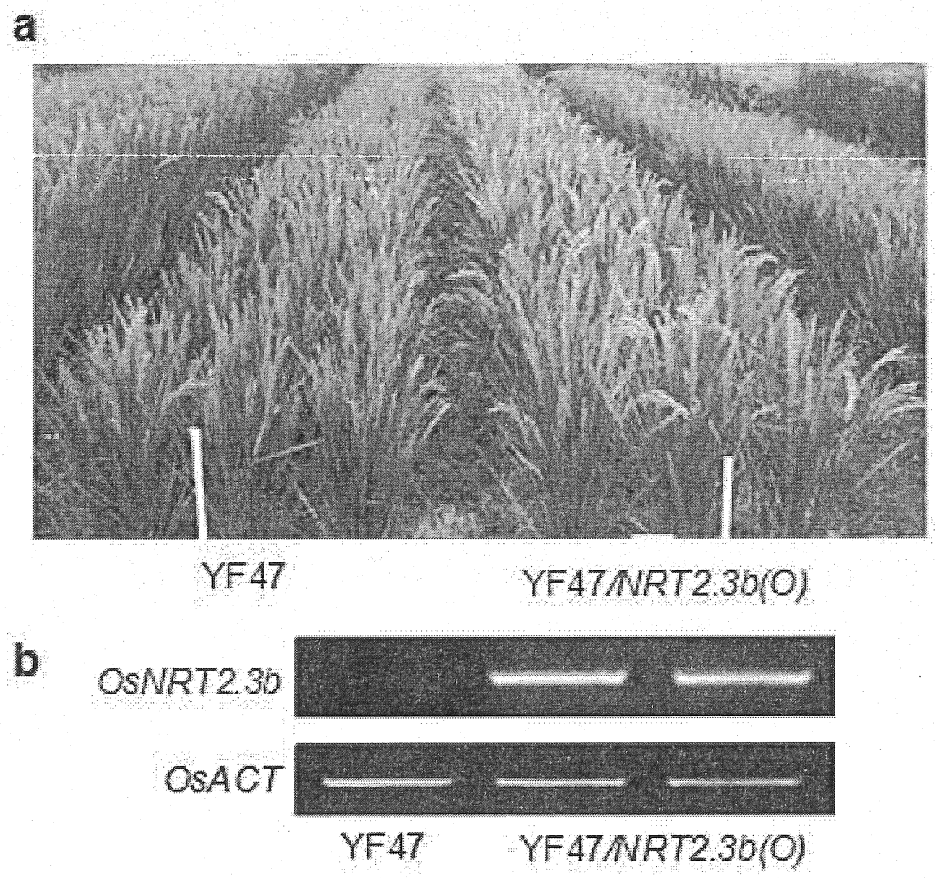

e
Năng suất hạt (kg/5 m²)
8
6
4
2
0
110 Kg N/ha
220 Kg N/ha
WYJ 396 369 366 342
f
NUE (g/gN)
150
120
90
60
30
0
110 Kg N/ha
220 Kg N/ha
WYJ 396 369 366 342

Fig.13


a
YF47
YF47/NRT2.3b(O)
b
OsNRT2.3b
OsACT
YF47
YF47/NRT2.3b(O)

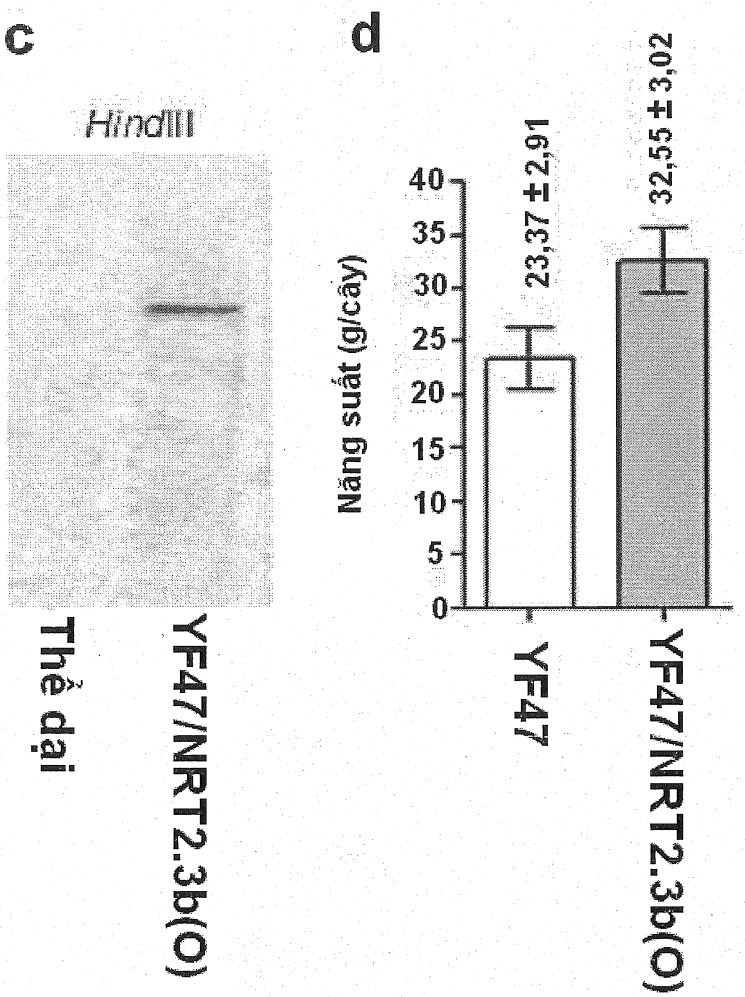


Fig.14

a

Thể dại (*Nipponbare*) b-S6

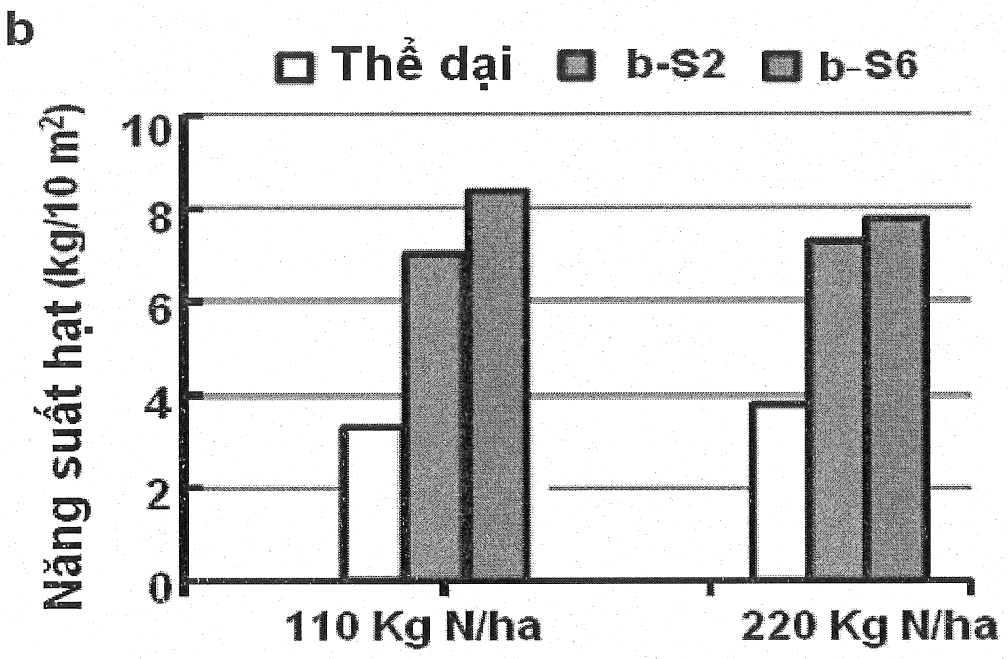
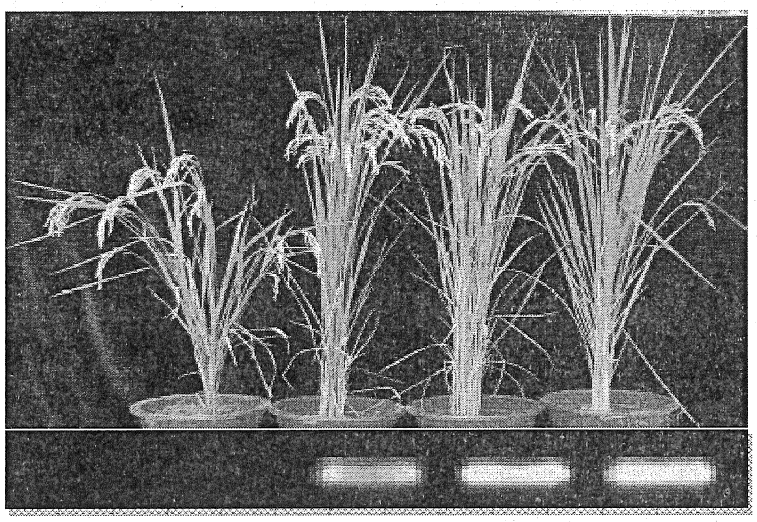


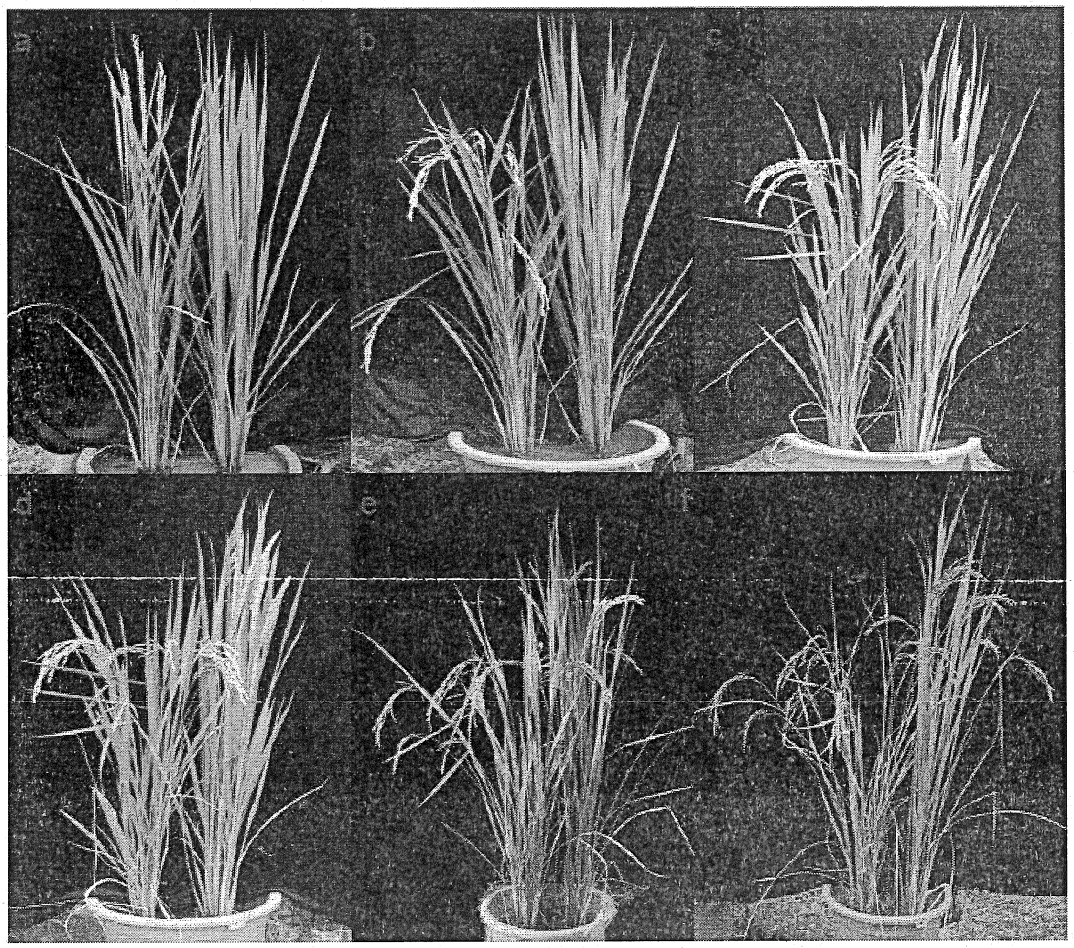
Fig.15



35S

Kiểu gen	aa	Aa	Aa	AA
Số lượng bản sao	0,05	0,98	1,22	1,93

Fig.16



Thể dại b-S6 Thể dại b-S6 Thể dại b-S6

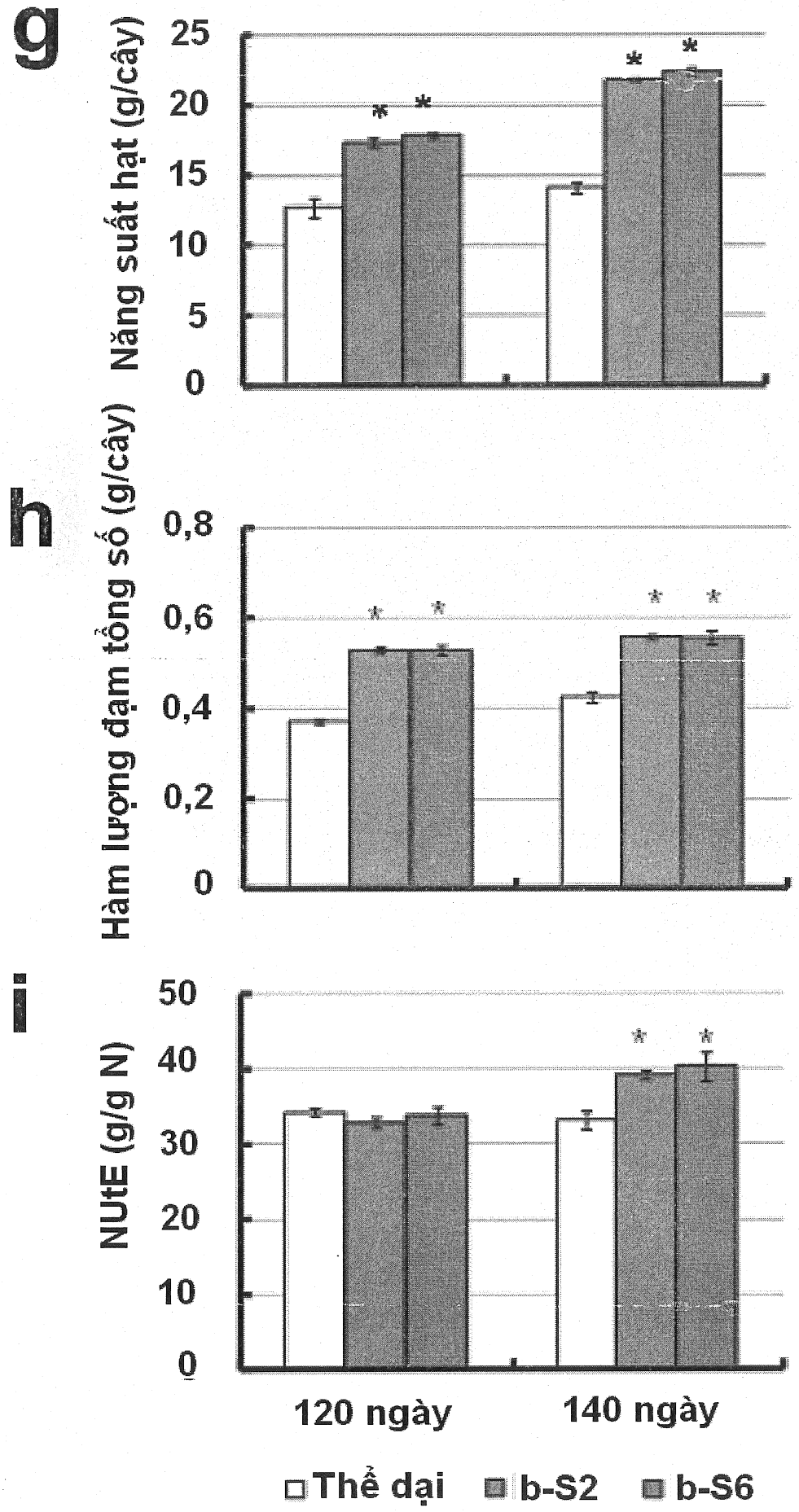

g
Năng suất hạt (g/cây)
25
20
15
10
5
0
h
Hàm lượng đạm tổng số (g/cây)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
i
NUtE (g/g N)
50
40
30
20
10
0
120 ngày
140 ngày
Thể dại
b-S2
b-S6

Fig.17

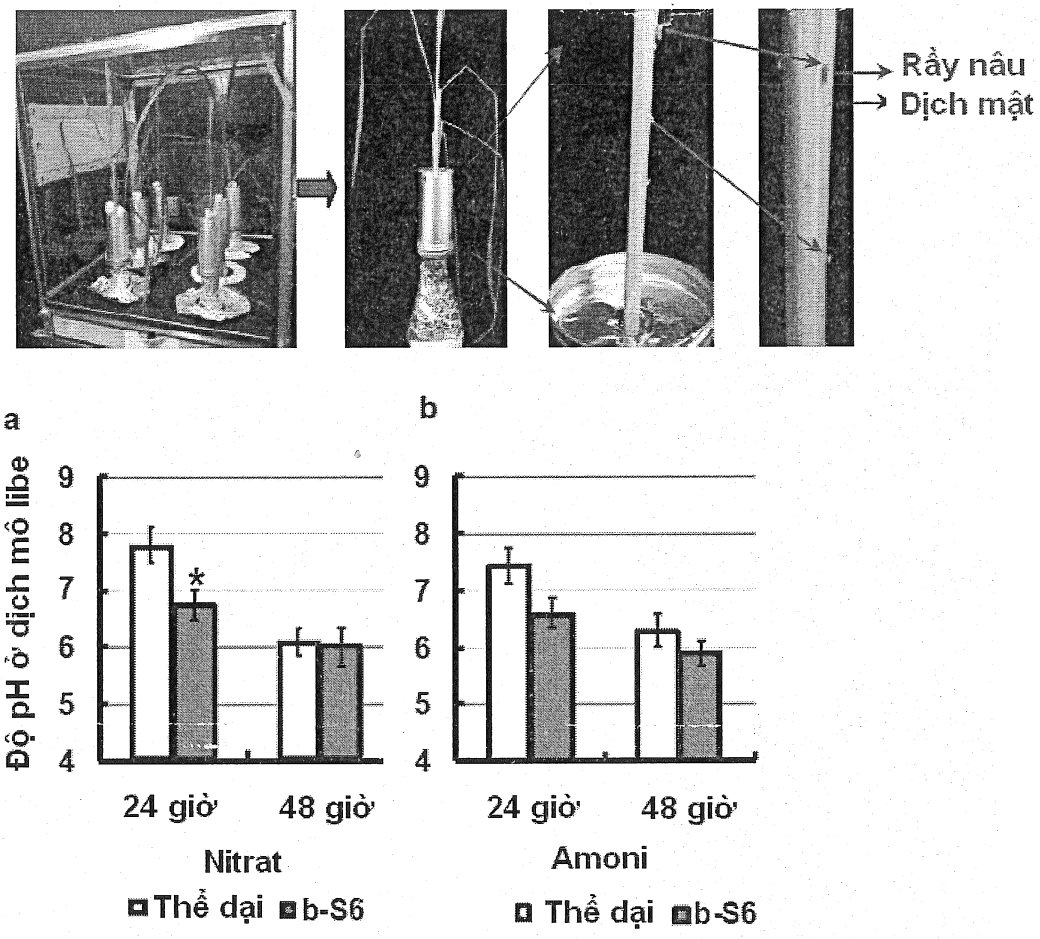
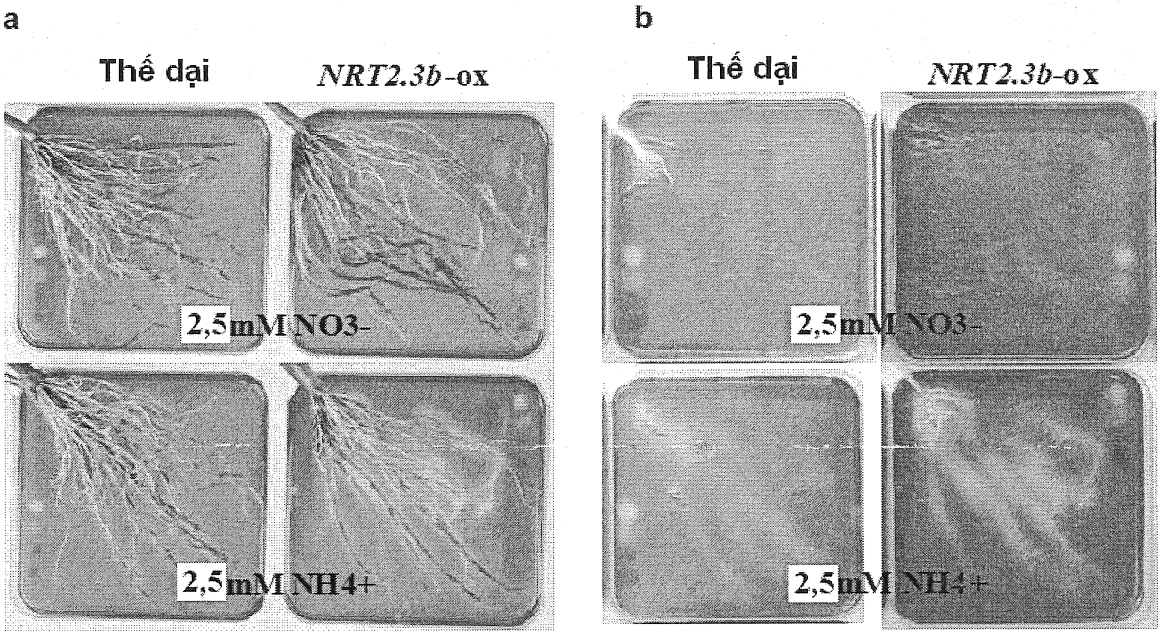

Rầy nâu
Dịch mật
a
b
Độ pH ở dịch mô libe
9
8
7
6
5
4
*
24 giờ
48 giờ
Nitrat
Amoni
Thể dại
b-S6

Fig.18


a
b
Thể dại
NRT2.3b-ox
2,5mM NO3-
2,5mM NH4+

c

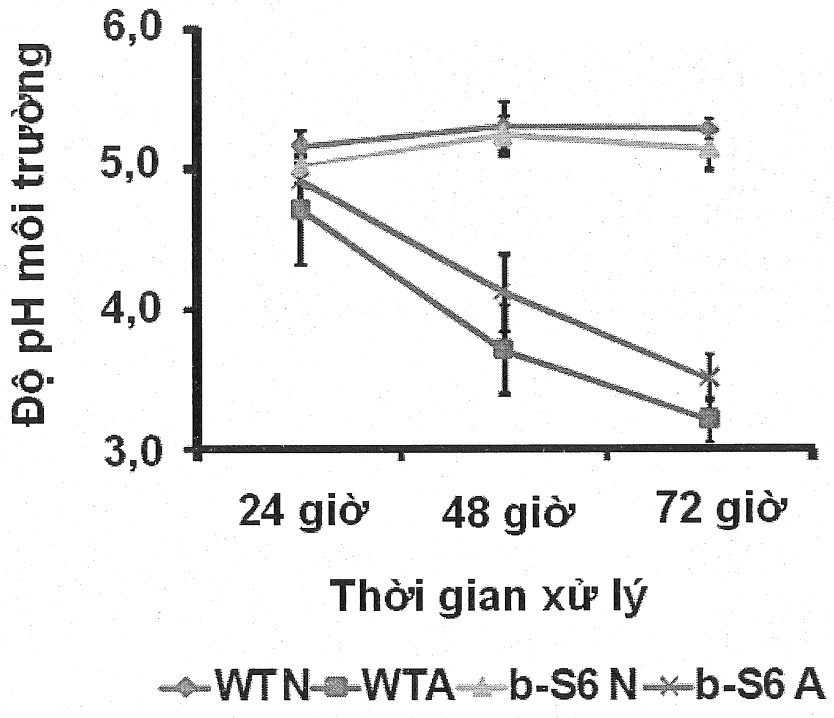

6,0
5,0
4,0
3,0
Độ pH môi trường
24 giờ
48 giờ
72 giờ
Thời gian xử lý
WT N
WTA
b-S6 N
b-S6 A

Fig.19

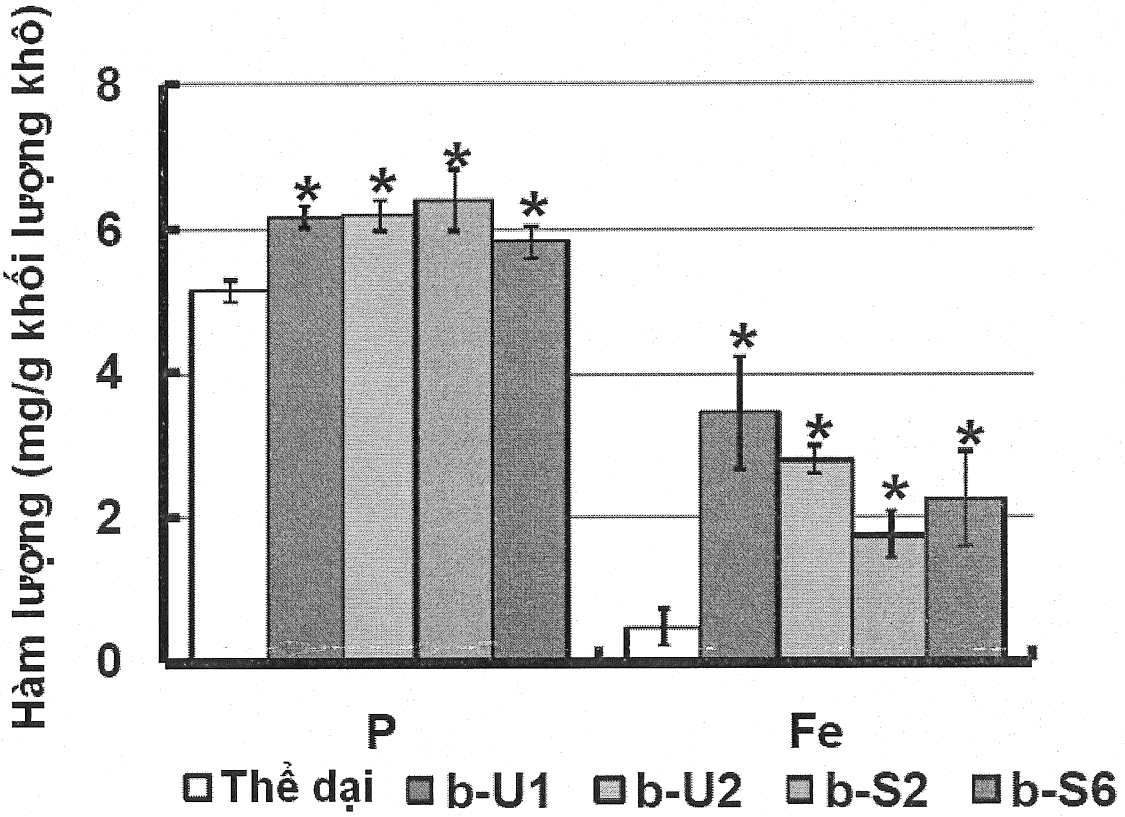

8
6
4
2
0
Hàm lượng (mg/g khối lượng khô)
P
Fe
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6

Fig.20

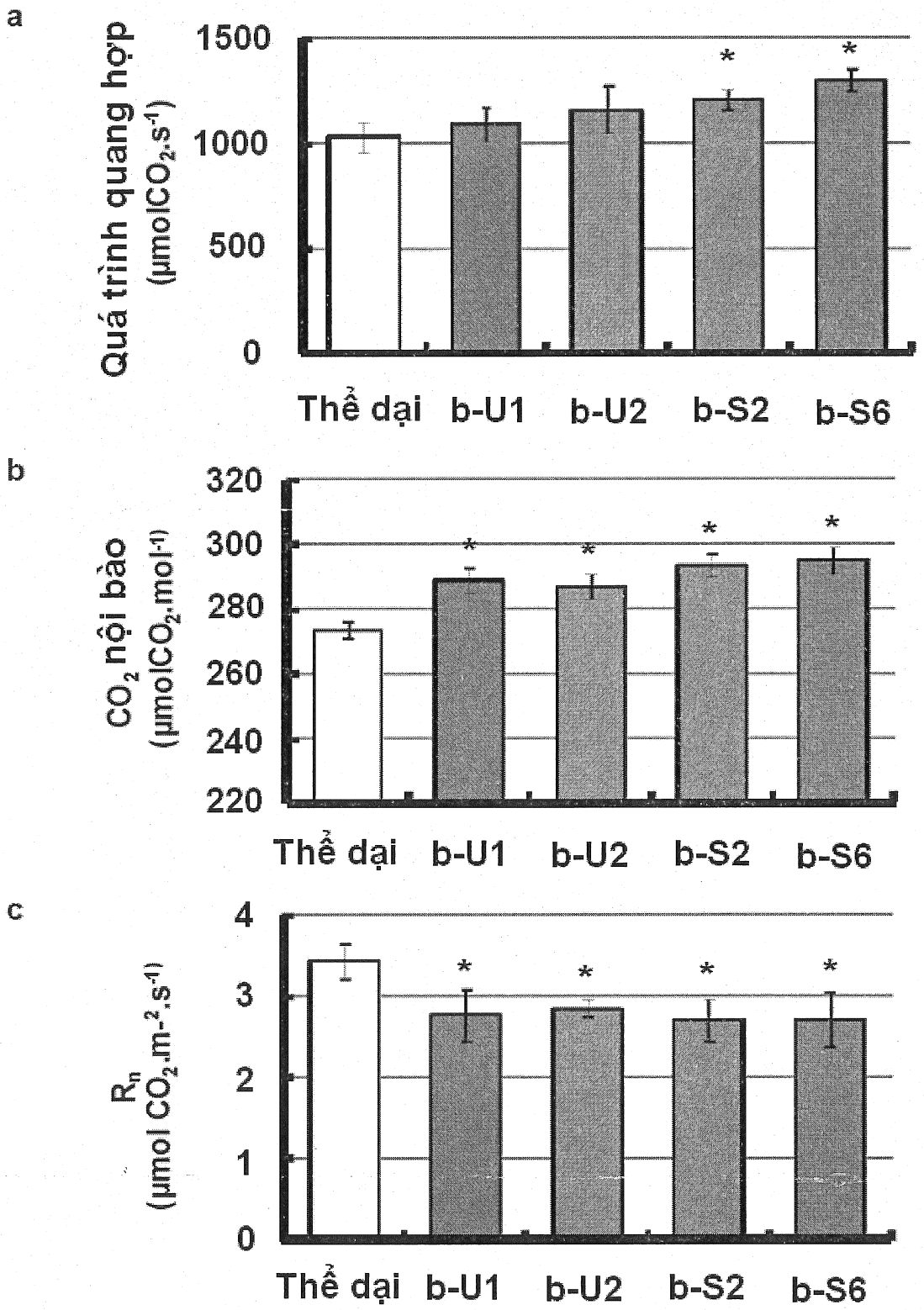
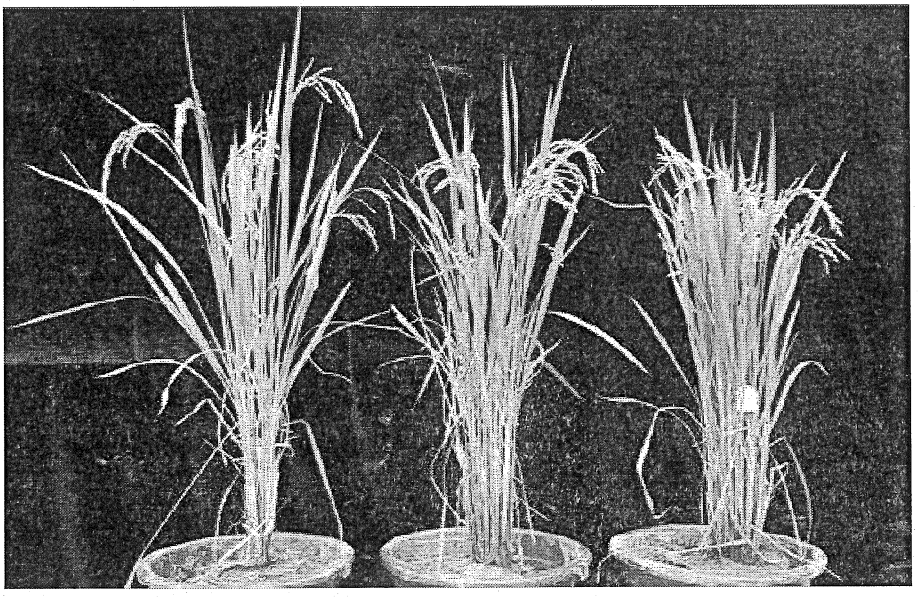

a
Quá trình quang hợp
(µmolCO2.s-1)
1500
1000
500
0
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6
b
CO2 nội bào
(µmolCO2.mol-1)
320
300
280
260
240
220
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6
c
Rn
(µmol CO2.m-2.s-1)
4
3
2
1
0
Thể dại
b-U1
b-U2
b-S2
b-S6

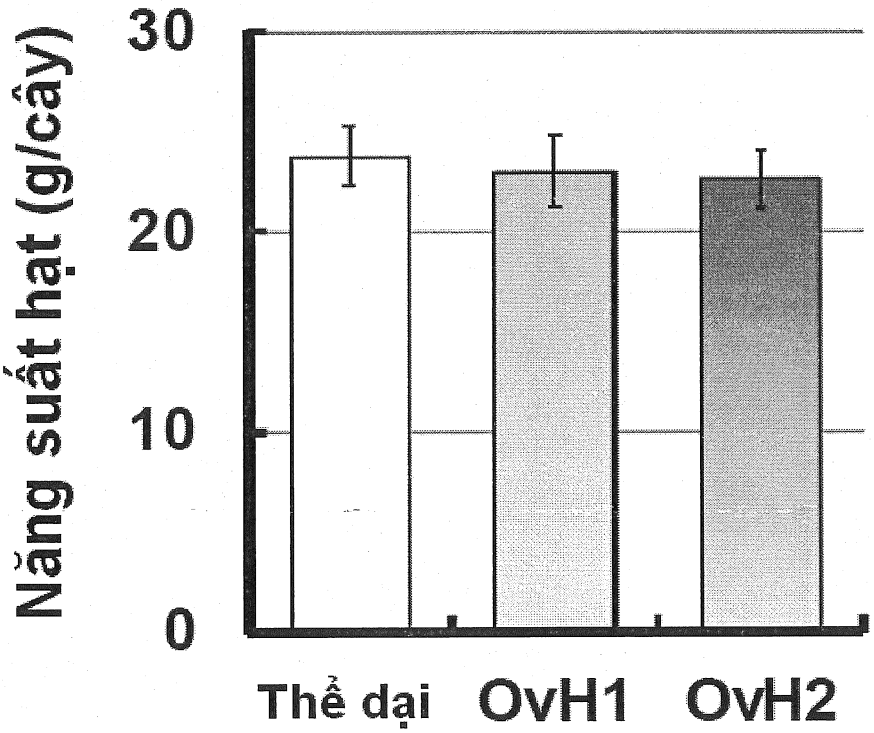
Fig.21

a

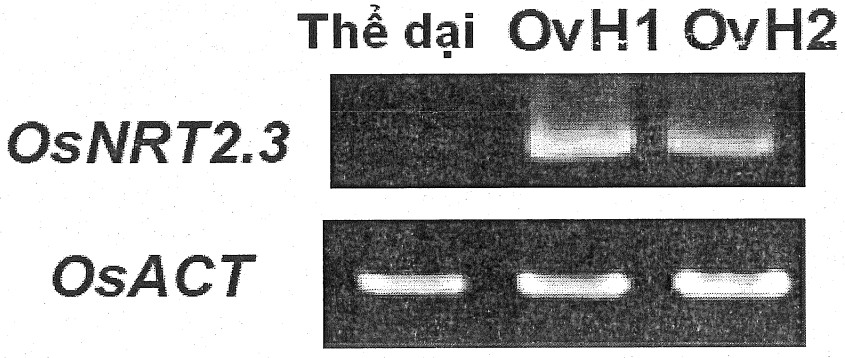


Thể dại OvH1 OvH2

b



c


Thể dại OvH1 OvH2
OsNRT2.3
OsACT

d

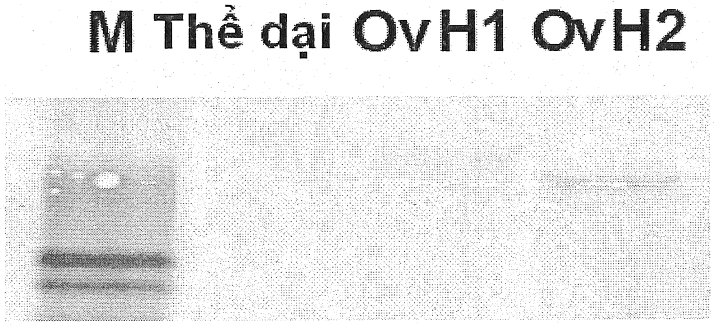

M Thể dại OvH1 OvH2

Fig.22

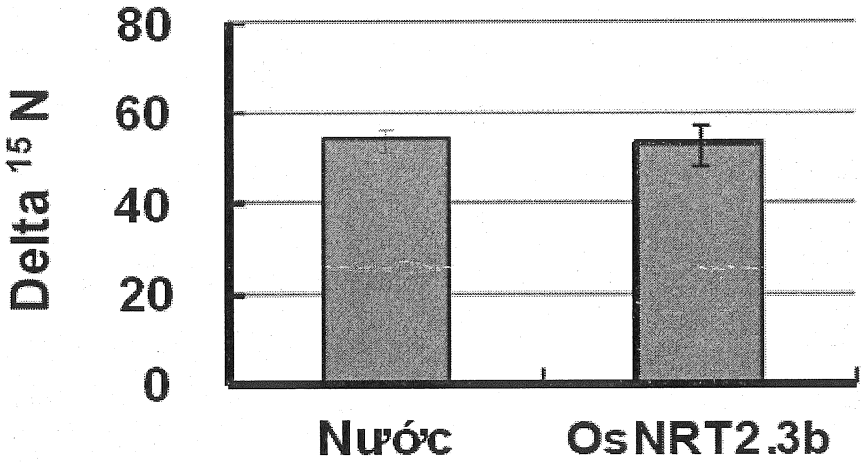
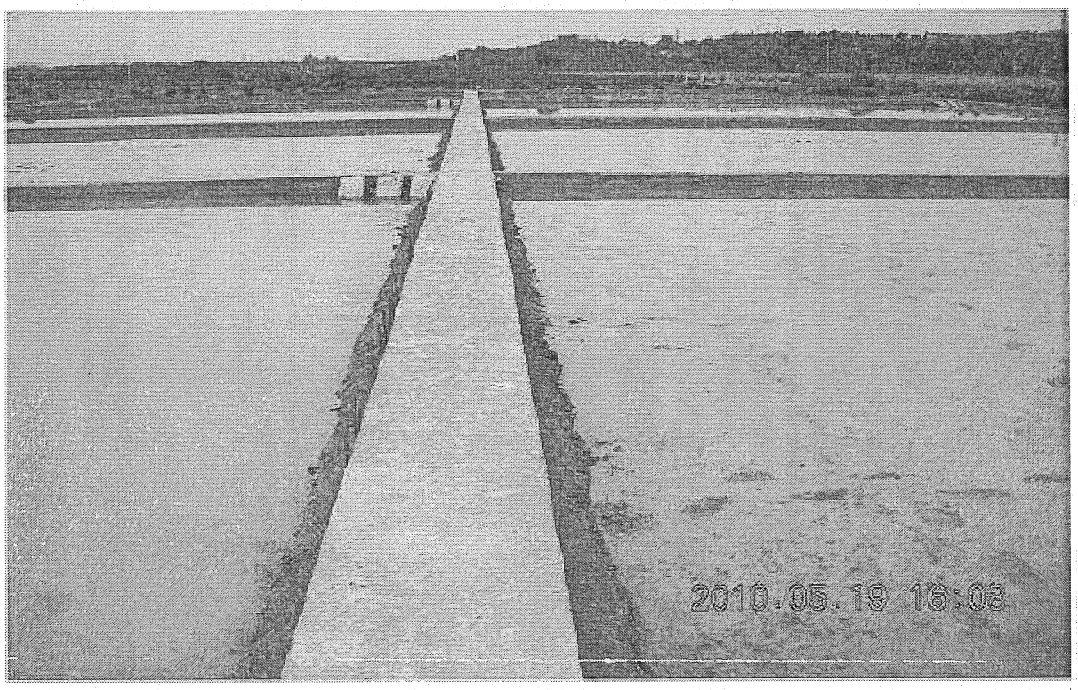

Delta 15 N
80
60
40
20
0
Nước
OsNRT2.3b

Fig.23

a



b

Thử nghiệm trên đồng ruộng	Bón phân đạm
0 kg N	300 kg N
75 kg N	150 kg N
75 kg N	75 kg N
75 Kg N	0 kg N

c

Các cây trong mỗi thửa ruộng được bón phân đạm				
b-S2	b-U1	b-S6	Thể dại	b-U2
b-U2	Thể dại	b-U2	b-S6	b-S2
b-U1	b-U2	Thể dại	b-S2	b-S6

d

Các cây trong mỗi thửa ruộng được bón 75 kg N/ha		
b-U2 10 hàng (25cm) x 128 cây (20cm)	Thể dại 10 hàng (25cm) x 128 cây (20cm)	b-S6 10 hàng (25cm) x 128 cây (20cm)

Fig. 24

Tên thông thường	Loài	Mã đăng ký	Cấu trúc 1	Vị trí 1	Cấu trúc 2	Vị trí 2
Mù tạc (AtNRT2.7)	*Arabidopsis thaliana*	AT5G14570	FFVGFSLANF SEQ ID NO. 41	136	EILIGGLGN SEQ ID NO. 42	259
Mù tạc hoa trắng	*Arabidopsis lyrata*	350602	FFVGFSLANF SEQ ID NO. 43	136	EILIGGLGN SEQ ID NO. 44	259
Cây rau tề	*Capsella rubella*	Carubv10008932m.g	FFVGFSLANF SEQ ID NO. 45	136	EILIGGLGN SEQ ID NO. 46	251
		Carubv10011028m	FSVASPI SEQ ID NO. 47	24	LWIIQTAGG SEQ ID NO. 48	355
Bạch dương	*Populus trichocarpa*	Potri.009G008500	FSVASPI SEQ ID NO. 49	24	LWIIQTAGG SEQ ID NO. 50	355
		Potri.009G008600	FSVASPI SEQ ID NO. 51	20	LWIIQTAGG SEQ ID NO. 52	351
Dưa chuột	*Cucumis sativus*	Cucsa.268720	WRIAFFVPGF SEQ ID NO. 53	213	LWILQTLGGVF SEQ ID NO. 54	344
Táo	*Malus domestica*	MDP0000239537	FSVASPI SEQ ID NO. 55	24	LWIIQTAGG SEQ ID NO. 56	335
Đào	*Prunus persica*	ppa004104m.g	FSVASPI SEQ ID NO. 57	24	LWIIQTAGG SEQ ID NO. 58	355
Đậu tương	*Glycine max*	Glyma13g39850	WRIAFFVPGF SEQ ID NO. 59	224	LWILQTLGGVF SEQ ID NO. 60	355
		Glyma12g30050	WRIAFFVPGF SEQ ID No 61	224	LWILQTLGGVF SEQ ID NO. 62	355
Cỏ đứa dại	*Brachypodium distachyon*	Bradi2g47640	FFIPGVMQTF SEQ ID NO. 63	209	LWVVQTIGG SEQ ID NO. 64	336

Lúa mạch	*Hordeum vulgare*	MLOC_75087.1*	FFIPGVMQTF SEQ ID NO. 65	209	LWVVQTIGG SEQ ID NO. 66	336
Ngô	*Zea mays*	GRMZM2G455124*				
Lúa mỳ	*Triticum aestivum*	đoạn tiếp giáp276340*				
		đoạn tiếp giáp14141				
		đoạn tiếp giáp2095384				

Fig. 25

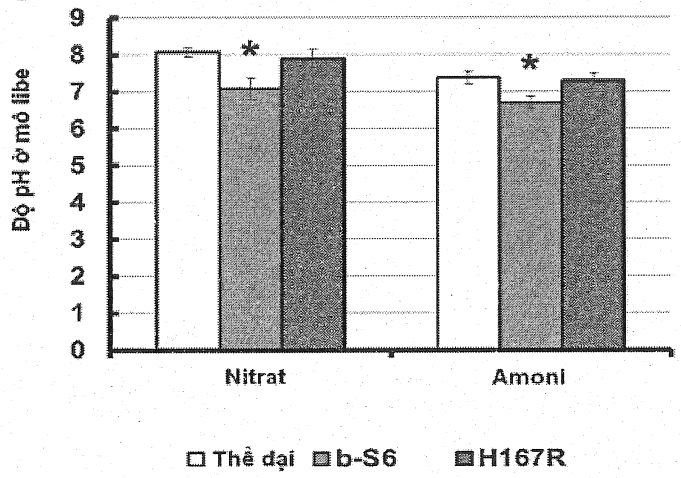


Fig.26

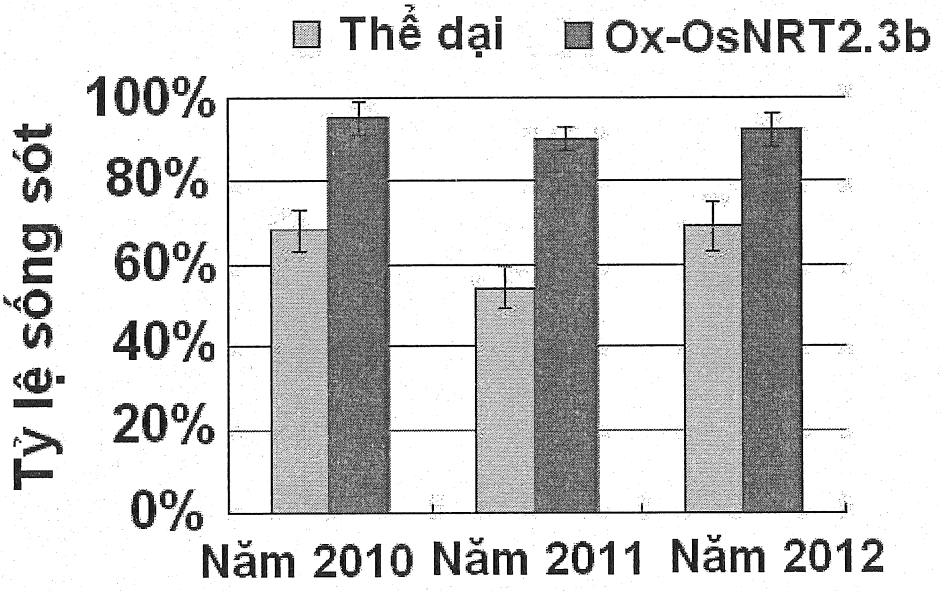

Thể dại
Ox-OsNRT2.3b
Tỷ lệ sống sót
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Năm 2010
Năm 2011
Năm 2012

Fig.27

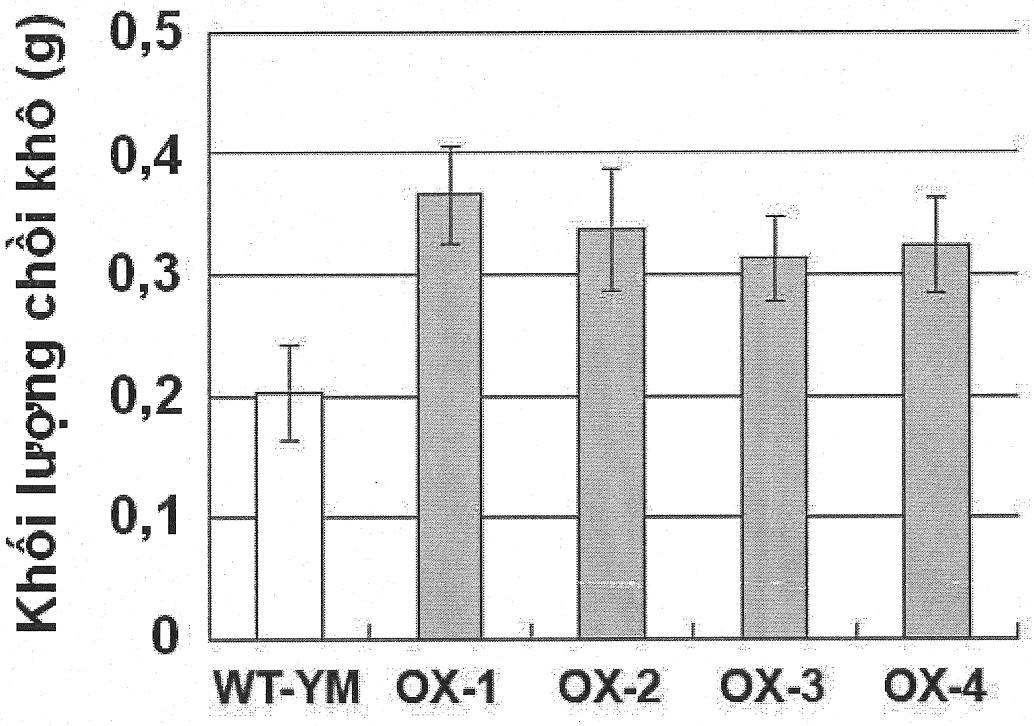
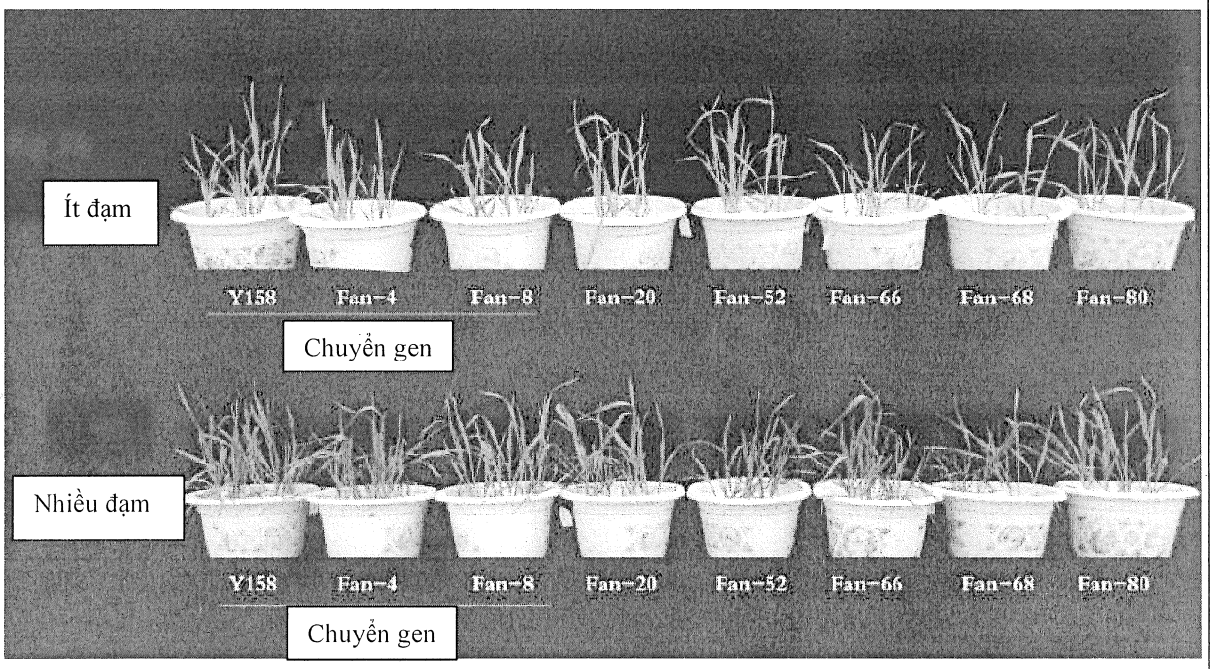

Khối lượng chồi khô (g)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
WT-YM
OX-1
OX-2
OX-3
OX-4

Fig.28


Ít đạm
Y158
Fan-4
Fan-8
Fan-20
Fan-52
Fan-66
Fan-68
Fan-80
Chuyển gen
Nhiều đạm
Y158
Fan-4
Fan-8
Fan-20
Fan-52
Fan-66
Fan-68
Fan-80
Chuyển gen